Wechselbeziehungen zwischen Azotobakter in der Rhizosphäre und den Wurzeln alkaloidführender Pflanzen

von

CHRISTA VAUPEL

1963

Wechselbeziehungen zwischen Azotobakter in der Rhizosphäre und den Wurzeln alkaloid-führender Pflanzen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt

von

Christa Vaupel

aus

Marburg/Lahn

1963

1.Berichterstatter: Prof.Dr.F.Bukatsch
2.Berichterstatter: Prof.Dr.L.Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1962.

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung 1

1. Teil

Vorkommen von Azotobakter in der natürlichen Umgebung alkaloidhaltiger Pflanzen 4

2. Teil

Einfluß von Azotobakter in der Rhizosphäre auf Wachstum und Alkaloidgehalt von Datura-stramonium-Pflanzen 7

Material und Methodik 7
Versuchsergebnisse 1o

3. Teil

Einfluß der Alkaloide Atropinsulfat, Hyoscyaminhydrobromid und Scopolaminhydrobromid auf verschiedene Azotobakterstämme 22

Material und Methodik 22
Versuchsergebnisse 24

1. Wachstum 24
2. Atmung 35
3. Trockengewichtsbestimmung 44
4. Stickstoffbestimmung 45
5. Viskosität 47
6. Melanin 54

4. Teil

Wirkung natürlicher Pflanzensäfte auf Azotobakter.. 58

Diskussion 61

Zusammenfassung 64

Literaturverzeichnis 67

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0004

Einleitung

Im Jahre 1806 isolierte der Apotheker SERTÜRNER aus Opiumkuchen einen schlafbringenden kristallinen Körper, das Morphin, das er wegen seiner alkalischen Reaktion als verwandt mit Kalium-, Natrium- und Ammoniumhydroxyd annahm und daher als "Alkaloid" bezeichnete. 1819 schlug MEISSNER den Terminus "Alkaloid" für einen in Sabadilla gefundenen Stoff vor. Seit dieser Zeit wurden nun über 700 Alkaloide isoliert und etwa 150-200 bereits genau analysiert. Die Alkaloidforschung dehnt sich immer weiter aus. Der Russe SCHAZKIJ ging 1890 sogar so weit, daß er an Hand der verschiedenen Alkaloidgruppen eine Systematik der Botanik aufstellte. Auch MOLISCH fand in einzelnen Fällen - z.B. Fam. Solanaceae - die Verwandtschaft durch das Vorkommen best. Alkaloide bestätigt.

Bis heute ist man sich über diese Stoffgruppe und ihre physiologische Bedeutung für die Pflanze noch nicht recht im Klaren. Vielfach wollte man sie lediglich als Stoffwechsel-Endprodukte auffassen, sozusagen als "Schlacken" in der Pflanze.

MOTHES, der sich eingehend mit Alkaloidpflanzen beschäftigt, bringt auch keine eindeutige Erklärung für dieses Problem. Ein kurzer Auszug seines Vortrages: "Neue Untersuchungen an Alkaloidpflanzen" besagt: " ... Selbst wenn sich herausstellte, daß Alkaloide keine Aufgabe im Stoffwechsel erfüllen, wäre es möglich, daß der Prozeß ihrer Bildung nicht nur unumgänglich, sondern vielleicht sogar nötig wäre. Es ist jedenfalls merkwürdig, daß die Untersuchungen von vielen 100 Herkünften von Atropa-, Datura-, Nikotiana-Arten niemals eine wirklich alkaloidfreie Pflanze geliefert haben, keine lebensfähige, alkaloidfreie Mutante. Die Tatsache, daß so interessante Stoffe in der Wurzel entstehen, und daß

solche Stoffe in den Sproß transportiert werden, wirft die Frage auf, welche Bedeutung sie für den Sproß haben ..."

Wäre bei einfachen "Abfallprodukten" diese Dominanz bestimmter Alkaloidgruppen in ganz bestimmten Pflanzengruppen notwendig, wie z.B. die Atropagruppe bei den Solanaceen ? Als wichtigste Bestandteile werden u.a. die Basen Atropin, Hyoscyamin und Scopolamin genannt. Diese sollen die Grundlage für folgende Arbeit sein.

Atropin wurde um das Jahr 1830 durch MEIN und Hyoscyamin drei Jahre später durch GEIGER und HESSE isoliert. Die physiologische Wirkung auf den höheren Organismus ist stichwortartig in "Index Merck 1961" aufgeführt. Wir finden dort sogar genau die verträgliche Tagesdosis angegeben. Wir kennen heute somit die medizinischen Folgen der "Alkaloid-Arznei".

Wie jedoch reagieren zum Beispiel Mikroorganismen, die in der Natur in der Rhizosphäre alkaloidhaltiger Pflanzen vorkommen, auf diese Stoffe ?

NIEMER, BUCHERER und KOHLER konnten 1959 aus Erde von Atropa belladonna, der Tollkirsche, ein atropinzersetzendes Bakterium isolieren. Sie gaben ihm die Bezeichnung "Corynebacterium belladonnae nov.sp.". Ich zitiere wörtlich: "... Der Mikroorganismus verwertet Atropin, Hyoscyamin, Scopolamin, Tropin und Tropinon als alleinige N- und C-Quelle ohne jeden Zusatz von Vitaminen oder Wuchsstoffen".

1930 bereits unternahm POSCHENRIEDER ausgedehnte Untersuchungen über das Vorkommen N_2-bindender Bakterien in Rhizosphären höherer Pflanzen und teilte die Ansicht von HILTNER, daß zwischen Wurzel und Mikroflora ihrer engen Umgebung Wechselbeziehungen bestehen.

BUCHERER zeigte in früheren Arbeiten (1942, 1943), daß wohl die meisten in der Natur gebildeten organischen Gifte von bestimmten Mikroben abgebaut werden können und somit dem Kreislauf der Stoffe in der Natur unterliegen. METZ 1955 fand bei seinen "Untersuchungen über die Rhizosphäre "starke Hemmwirkung einiger Wurzeln auf die umgebende Mikroflora und schloß ebenfalls auf eine direkte Wirkung der hemmenden Wurzelstoffe außerhalb der Rhizosphäre.

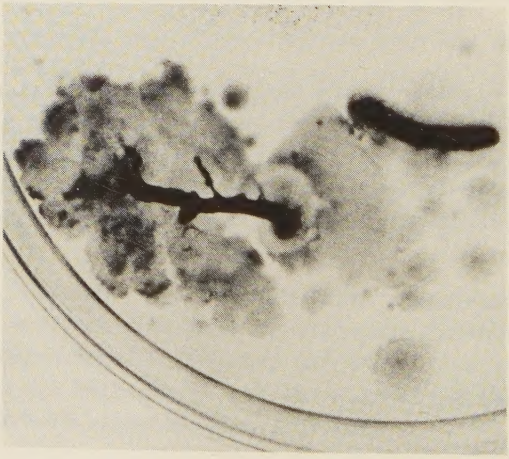
BUKATSCH konnte in seiner Arbeit : "Zur Analyse der Bakterienhemmstoffe aus der Wurzel von Schöllkraut und ähnlichen Pflanzen" (1956) die hemmende Wirkung bestimmten Alkaloiden zuschreiben. Er fand als wirksame Stoffe die Alkaloide: Berberin, Chelerythrin und in geringem Ausmaß auch Sanguinarin. Diese gelangen - wenigstens teilweise - auch aus der unverletzten Wurzel in den Boden und vermögen somit Azotobakter aus der engeren Rhizosphäre des Schöllkrautes fernzuhalten. Die einzeln geprüften Azotobakterstämme zeigten sich unterschiedlich empfindlich.

Findet sich vielleicht ein ähnliches Phänomen bei den Alkaloiden der Solanaceen und Azotobakter ? Läßt sich eine Art Wechselbeziehung Pflanze-Mikroorganismus, Mikroorganismus-Pflanze feststellen ? Diesem Fragenkomplex versuchen wir in der folgenden Arbeit nachzugehen.

1. Teil

Vorkommen von Azotobakter in der natürlichen Umgebung alkaloidhaltiger Pflanzen

Wir versuchten zunächst, Azotobakter-Stämme in der Rhizosphäre bestimmter Pflanzen des botanischen Garten München nachzuweisen und zu isolieren. Zu diesem Zweck brachten wir gründlich mit Leitungswasser abgewaschene Wurzelstücke auf Mannit-Agar, das stickstoffreie optimale Medium für dieses Bakterium. Trotz der optimalen Temperatur im Brutschrank ließ sich bei "Convallaria majalis" und bei "Corydalis cava" kein Azotobaktervorkommen nachweisen. Hingegen zeigte sich bei "Solanum nigrum" schon nach kurzer Zeit eindeutiges Bakterienwachstum in unmittelbarer Umgebung der aufgelegten Wurzelstücke: siehe Abb. 1.



Wir isolierten diesen Stamm und gaben ihm die Bezeichnung "Solanum nigrum". Weiter isolierten wir einen Bakterienstamm an Papaverwurzeln. Dieser zeigte jedoch ein sehr langsames Wachstum, so daß er für spätere Versuche ausschied.

Ein besonders deutliches Beispiel für das Vorkommen von Azotobakter fanden wir an Datura-Samen. Diese hatten wir selbst in der Umgebung von Wien gesammelt. Sie sollten für spezielle Keimversuche auf gelinde Weise steril gemacht werden. Zu diesem Zweck behandelten wir sie eine 3/4 Stunde mit 3 % H_2O_2 und legten sie anschließend über Nacht in Leitungswasser. Am Morgen in einer sterilen Petrischale mit Mannitagar bei 23°C in den Brutschrank gebracht, bildeten sich um die angeblich "sterilen" Samen dichte Bakterienringe aus. Ausstriche ergaben einen fast reinen Azotobakterstamm. Wuchsform und physiologisches Verhalten glichen weitgehend dem Stamm Nr. 4412 der amerik. Type-Culture-Collection. Wir isolierten dieses Bakterium und gaben ihm die Bezeichnung "Datura Wien".

Aber nicht nur außen an der harten und skulpturierten Samenschale vom Stechapfel sollten wir Azotobakter in so schöner Reinkultur finden. Dieses Bakterium war sozusagen ins Innere der Samenschale eingedrungen, wie folgender Versuch zeigt:

Wir behandelten die Samen 3 Min. mit 70%igem Alkohol und brachten sie anschließend zur Entfernung letzter Alkoholspuren für 165 Min. in einen Exsikkator. Eine Sterilitätsprobe der so behandelten Samen auf Mannit-Agar bei 23°C im Brutschrank zeigte wirklich kein Bakterienwachstum mehr. Anschließend lösten wir mit abgeflammter Pinzette vorsichtig die harte Samenschale - ohne das Samenhäutchen zu beschädigen - und brachten ohne weitere Behandlung die Samen

erneut auf sterile Mannit-Agarplatten. Wieder entwickelte sich bereits nach kurzer Zeit ein üppiges Bakterienwachstum - Azotobakter sozusagen in Reinkultur - um die aufgelegten Samen.

Sind es hier vielleicht die Alkaloide, die Azotobakter begünstigen ?

Im Falle von Datura können wir uns auf die drei Hauptbasen Atropin, Hyoscyamin und Scopolamin beschränken.

2. Teil

Einfluß von Azotobakter in der Rhizosphäre auf Wachstum und Alkaloidgehalt von Datura stramonium-Pflanzen

Material und Methodik

In unseren Versuchen verwendeten wir den Bakterienstamm ATCC 4412 (Americ.Type-Culture-Collection) aus dem botanischen Institut München und z.T. auch das selbst isolierte Bakterium "Datura Wien". Diese wurden auf Schrägröhrchen bei Zimmertemperatur gehalten, immer wieder überimpft und wiederholt mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Die Zusammensetzung des Nährbodens wird im 3. Teil genau angegeben.

Datura stramonium-Samen aus den Jahren 1959 und 1960 stammten aus dem botanischen Garten München. Diese wurden unvorbehandelt mit der Pinzette geschält, 1/2 Min. einzeln in starkes Bromwasser getaucht, in sterilem Leitungswasser gut nachgespült und in sterile Petrischalen mit Filtereinlage - getränkt mit sterilem Leitungswasser - zum Auskeimen in den Brutschrank bei 23°C gebracht. (Vor jeder Versuchsserie erfolgte immer der Nachweis der Sterilität durch Auflegen auf Mannit-Agarplatten im Brutschrank).

Sobald die Samen gut ausgebildete Wurzeln zeigten, überführten wir sie erneut in frische, sterile Petrischalen mit Leitungswasser und stellten diese in eine Lichtkammer mit ∽ 3000 Lux. Der eigentliche Versuch - Kulturen ohne und mit Bakterienbeimpfung - begann erst, nachdem die beiden Primärblätter das Samenhäutchen abgestreift hatten.

Als Kulturgefäße dienten große Glaszylinder, abgedeckt mit einer Glasplatte. Das Kulturmedium stellte steriler Quarzsand dar, schwach durchtränkt mit steriler Knop-Nährlösung (pH 7).

Der Quarzsand aus dem botanischen Garten München wurde gründlich mit Aqua dest. gewaschen und anschließend 24 Std. bei 1oo°C sterilisiert.

Der Versuch lief über mehrere Wochen in einer Lichtkammer (Länge 1,26 m; Breite o,42 m; Höhe 1,43 m) mit 5 Leuchtstoffröhren weiß (Osram-L, 4o W/15 R) jeweils im Abstand von 2 cm voneinander und o,47 m über der Bodenfläche aufgehängt (27oo-33oo Lux). Die Kulturen wurden regelmäßig von 6 bis 2o Uhr beleuchtet.

Nach beendeter Versuchsserie trockneten wir die Pflanzen zwei Tage bei 65°C.

Die spätere Alkaloidextraktion erfolgte nach ROMEIKE. Wir bestimmten zunächst das Trockengewicht des Ausgangsmaterials, zerkleinerten die feinen Stengel und Wurzeln vorsichtig mit dem Mörser in der Reibschale. Die Mazeration wurde weitere 3c Min. fortgesetzt unter Zugabe von 3o + 1o ml absolutem Äthanol. Nach Filtration durch "Whatman-Papier Nr. 4" und zweimaligem Nachspülen der Reibschale und Filter mit je 1o ml Alkohol abs. wurde der Schliffkolben an die Wasserstrahlpumpe (mit geringem Druck) über eine Woulffsche Flasche angeschlossen und bei 45°C im Wasserbad bis zur Trockene eingedampft. Den Rückstand lösten wir in 7 ml Chloroform und gaben 1o ml 6%ige Essigsäure zu. Das Chloroform wurde anschließend bei 6o°C restlos vertrieben. Wir filtrierten den essigsauren Extrakt durch "Whatman-Papier Nr. 4" in einen Schütteltrichter, spülten mit 5 + 1o ml H_2O dest. den Schliffkolben und das Fil ter nach, alkalisierten mit 14 ml 5%igem Ammoniak

und schüttelten intensiv 1/2 Std. mit 15 ml Chloroform aus. Die Chloroformphase trennten wir ab, während die ammoniakalische Lösung ein zweites Mal bis zur Trockene eingedampft wurde, um dann durch Zugabe von 2,5 ml Chloroform auch tatsächlich quantitativ die Atropa-Alkaloide zu erfassen. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden einige Tage bis zur quantitativen Bestimmung mit Hilfe der Papierchromatographie gut verschlossen im Eisschrank verwahrt und erst dann auf das gewünschte Volumen eingeengt.

Von einer genau bestimmten Menge an Pflanzenmaterial - wenn möglich o,2 g - trugen wir quantitativ mit einer geeichten Elphor-Pipette jeweils mehrmals o,oo5 ml des Chloroformauszuges auf einen vorher markierten Fleck auf der Startlinie, 3om vom unteren Rand entfernt, auf. Als Vergleichssubstanzen liefen mit: wässrige Lösungen von Atropinum sulfuricum cryst. 1575, DAB 6, H.A.B. 2, B.P. 1958, Hyoscyaminum hydrobromicum cryst. 4621 B.P.C. 1949, Scopolaminum hydrobromicum 77o1, DAB 6, B.P. 1958, E. Merck AG., Darmstadt.

Die Chromatographie erfolgte auf 3o:3o cm messenden Bögen (Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2o43b) nach der aufsteigenden Methode in Butanol-Eisessig-Wasser (loo:lo: gesättigt). Nach 15-16 std. Laufzeit trockneten wir das Chromatogramm ca. 9o Min. über der Heizung und besprühten es anschließend mit jeweils frisch zubereitetem DRAGENDORFF-Reagenz nach MUNIER und MACHEBOEUF. Ca. 1 Std. später markierten wir in durchscheinendem Licht die rötlichen Flecken auf gelblich-rötlichem Grund.

24 Std. später bestimmten wir an Hand der Photozelle den Lichtwert.

Vgl. zur Methode: SCHLÜTER 1959 Zentralblatt f. Bakt., Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene II, Abt. 112 (S. 52o-521). Der Lichtwert - berechnet aus der Differenz von Farbintensität der DRAGENDORFF-Alkaloidflecken und der Blindwerte des besprühten Papiers - wird in Beziehung gesetzt zur Fleckengröße. Letztere bestimmten wir mit Hilfe eines Planimeters.

$$M = k \cdot l \cdot f$$

l = errechneter Lichtwert
f = Fleckengröße
k = Proportionalitätsfaktor (für unsere Berechnung willkürlich = 1 gesetzt)

Diese für M gefundenen Zahlen sind zwar von der Alkaloidkonzentration abhängig, stellen jedoch keine Absolutwerte dar.

Für die Eichkurven der drei Hauptalkaloide der Atropa-Gruppe wählten wir verschiedene, bekannte Konzentrationen der Reinsubstanzen in wässriger Lösung und konnten auf diese Weise die geringen Alkaloidmengen in sterilen und infizierten Pflanzenkulturen zumindest quantitativ vergleichen.

Versuche und Ergebnisse

In "California Agriculture" vom Juni 196o wurde als möglicher Grund einer verschlechterten Keimung und Entwicklung gewisser Pflanzen das Vorkommen bestimmter Alkaloide angegeben. Wir prüften daher zunächst in Vorversuchen, ob durch frühzeitige Infektion der Datura-Samen mit dem arteigenen Bakterienstamm "Datura Wien" eine Beschleunigung oder Verzögerung des Wachstums zu beobachten war. Zu diesem Zweck brachten wir die geschälten, sterilen Samen auf sterile Mannit-Agarplatten, die im einen Fall mit einer Bakterienaufschwemmung durchfeuchtet waren, während wir der Kontrolle reines, steriles Leitungswasser zusetzten. Nach 6 Tagen Anzucht im Brutschrank zeigte sich eine geringe Beschleunigung in der Rhizoidbildung der sterilen Kulturen.

Die Wurzeln der Bakterienplatte hatten keineswegs das Bestreben, in die Dichtsaat der Bakterien hineinzuwachsen. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten wir sozusagen unseren Bakterien optimale Lebensbedingungen - Mannit-Nährboden und 23°C - geboten. Zum Ausgleich sorgten wir anschließend für eine möglichst günstige Lebensweise für unsere Pflanzen. Wir brachten sowohl alle sterilen wie alle infizierten Samen mit oder ohne Wurzelbildung in neuen Petrischalen mit Filtereinlage - in beiden Fällen getränkt mit Knopscher Nährlösung - erneut in den Brutschrank. Der weitere Arbeitsgang verlief völlig normal. Alle Keimlinge mit guter Wurzelbildung kamen in neue Petrischalen mit Leitungswasser. Beim späteren Auspflanzen in Quarzsand erfolgte keine weitere Infektion.

36 Tage nach der Samenaussaat - davon 21 Tage in Quarzsand - zeigten sich äußerlich keine Unterschiede im Habitus zwischen steriler und infizierter Kultur. - Eine zur gleichen Zeit normal angesetzte Versuchsreihe, die erst im Augenblick der Übertragung in Quarzsand mit ATCC 4412 infiziert wurde, unterschied sich ebenfalls nicht in ihrem Phänotyp. -

Eine Sandprobe 37 Tage nach Versuchsbeginn zeigte eindeutig, wie gut die Bakterien das Überwechseln von Gefäß zu Gefäß bei der sehr frühen Infektion - vor und während der Keimung - vertragen hatten, und daß sie schließlich im Quarzsand lediglich bei Knopscher Nährlösung weiterwuchsen.

Nach diesen Vorversuchen arbeiteten wir bei den nun folgenden Pflanzenkulturen jeweils nach dem unter Arbeitsmethoden beschriebenen Schema.

Eine Datura-Serie pflanzten wir jeweils steril aus, eine andere infizierten wir gleichzeitig unter denselben Außen-

bedingungen mit ATCC 4412. Wir tauchten hierbei mehrmals mit abgeflammter Pinzette die kleinen Pflänzchen einzeln besonders mit ihren Wurzeln in eine Bakterien-Wasseraufschwemmung und gossen die restliche Flüssigkeit - außer der üblichen Knop-Lösung - in das Kulturgefäß.

Nach mehreren Wochen Versuchsdauer prüften wir anhand einer Sandprobe die Sterilität bzw. die Infektion mit ATCC 4412. Mit steriler Pinzette brachten wir Quarzkörnchen aus der Umgebung von Datura-Pflanzen auf eine Mannit-Agarplatte und ließen diese einige Zeit bei 23°C im Brutschrank stehen. In fast allen Fällen war das Ergebnis eindeutig. Die sterile Kultur war wirklich frei von N-autotrophen Organismen, während bei den infizierten Pflanzen Azotobakter prächtig im Umkreis der aufgelegten Sandkörnchen gedieh: siehe Abb. 2

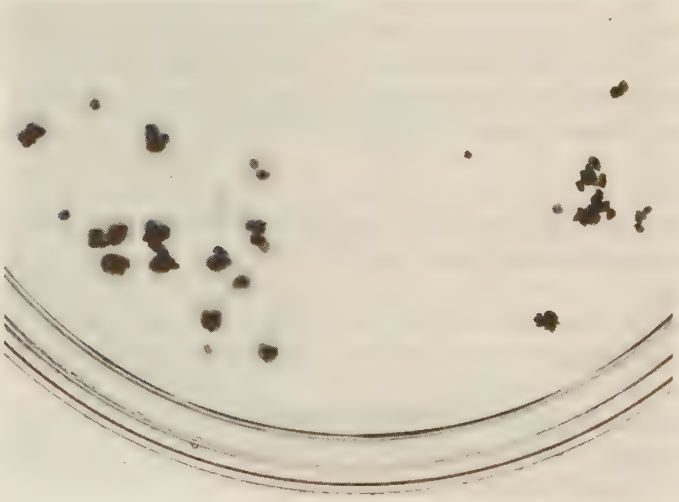


Abb.2: Quarzsandprobe 21 Tage nach Infektion (links ATCC 4412 infiziert; rechts steril)

Der Bakterienhof wurde mit der Zeit immer breiter. Um eine möglichst hohe Alkaloidausbeute zu erhalten, brachen wir nach mehreren Wochen immer morgens um 9 Uhr unsere Versuche ab, da nach SOKOLOV 1956/57 der Tagesrhythmus von Bedeutung ist. Der höchste Wert findet sich nach diesem Autor am Morgen und in der Nacht.

Wie wir schon in den Vorversuchen kurz erwähnten, konnten wir auch hier keine Unterschiede im Habitus zwischen sterilen und infizierten Pflanzen feststellen. Die IES-Abscheidung von Azotobakter und ihre Auswirkung auf vermehrtes Sproßwachstum, wie sie BURGER und BUKATSCH 1958 in ihrer Arbeit: "Über die Wuchsstoffsynthese im Boden freilebender N-bindender Bakterien" nachweisen konnten, machte sich in unseren Versuchen nicht bemerkbar.

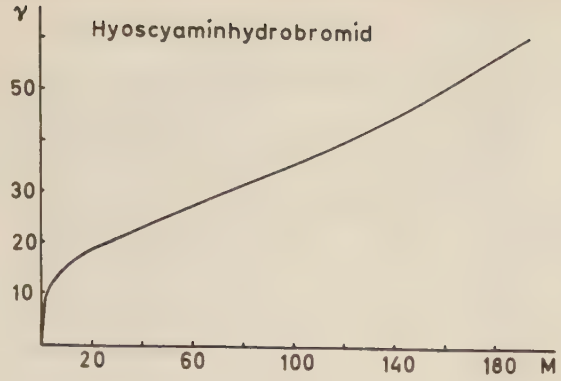
Durch die ärmlichen Kulturbedingungen hatten wir oft große Verluste an Pflanzenmaterial. Sie betrafen jedoch gleichermaßen infizierte wie sterile Pflanzen. Weiter konnten wir die relativ starke Brombehandlung der Samen nicht umgehen, da alle anderen Sterilisationsmethoden fehlschlugen und sich immer wieder Schimmelpilze ausbreiteten.

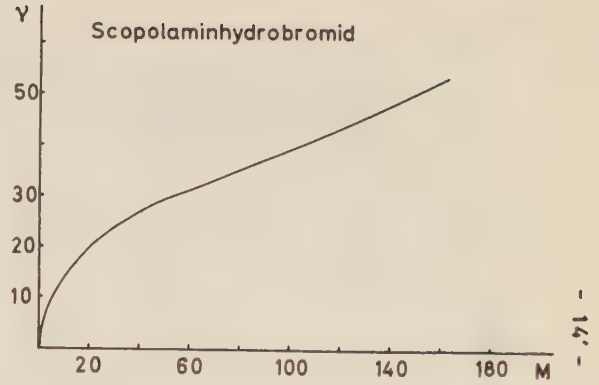
Nach WEHMER vermindert Pilzbefall den Alkaloidgehalt. Aus eigenen Versuchen können wir sagen, daß Azotobakter und Schimmel sich möglichst meiden. Somit könnte bei nicht wirklich sterilen Kulturbedingungen ein falsches Bild entstehen. Dann wäre auch der zum Vergleich herangezogene Alkaloidgehalt der "Steril-Kultur" bereits ein durch Pilze verminderter.

Wir machten daher bei jedem Pflanzenversuch jeweils zwei Sterilitätsproben, eine sofort nach der Behandlung der Samen und eine weitere in Form von Quarzsandkrumen nach

mehrwöchiger Kultur. Wir hoffen, auf diese Weise jene Fehlerquelle weitmöglichst ausgeschaltet zu haben.

Die unnatürliche Verkürzung der Keimzeit durch Entfernen der festen Schutzhülle - auch wenn wir uns bemühten, die reifsten Samen (schwarz) auszuwählen - überlebten nicht alle Keimlinge. Bei jeder Versuchsserie blieben auf diese Weise oft viele Samen ohne Wurzelbildung. Selbst wenn kleine Pflänzchen bereits herangewachsen waren, geschah es nicht selten, daß sie morgens plötzlich am Boden lagen.





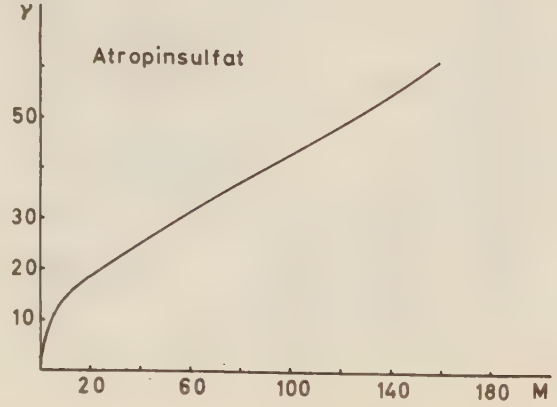


Abb. 3 Eichkurven:

Versuchsergebnisse

Datura-Pflanzen-Kulturen	Dauer der Infektion in Tg.	verarb. Trockengew.-Menge in mg	M ≏ Alkaloidkonz.	≏ Alkaloidmenge in γ			Zunahme gegenüber Kontrolle in %		
				At.	Hy.	Sc.	At.	Hy.	Sc.
sterile Kontrolle	66	14o	11,564	15	15,5	14,5			
infiz. ATCC 4412	"	"	13,728	16	16,5	16	6,7	6,5	1o,3
sterile Kontrolle	25	2oo	2o,124	18,5	18,5	19,5			
infiz. ATCC 4412	"	"	39,96o	25	23	27	35,1	24,3	38,5
sterile Kontrolle	28	2oo	22,484	19	19	2o,5			
infiz. ATCC 4412	"	"	3o,36o	22	21	23,5	15,8	1o,5	14,6
sterile Kontrolle	35	2oo	24,22o	2o	19,5	21,5			
infiz. ATCC 4412	"	"	27,528	21	2o,5	23	5	5,1	7
sterile Kontrolle	21	2oo	34,8oo	23,5	21,5	25			
infiz. ATCC 4412	"	"	5o,8oo	28,5	25,5	29,5	21,3	18,6	18
sterile Kontrolle	15	2oo	0	0	0	0			
infiz.ATCC 4412	"	"	94,5oo	41	34,5	38			

S o n d e r f a l l :

Blattlausbefall aller steriler wie infiz.Versuchspflanzen

Bei allen Versuchen konnten wir eine geringe bis deutliche Zunahme des Alkaloidgehaltes der mit dem Bakterienstamm ATCC 4412 infizierten Pflanzenkulturen gegenüber der sterilen Kontrolle feststellen. Auf dem Chromatogramm war diese Förderung bereits teilweise mit blossem Auge an einer schwachen Farbintensivierung der Alkaloidzone sofort nach dem Besprühen mit DRAGENDORFF-Reagenz sichtbar. Mit der Berechnung einer prozentualen Förderung des Alkalidgehaltes gegenüber den Sterilkulturen wollen wir jedoch vorsichtig sein, da es sich um γ handelte und bereits im Meßwert ein mittlerer Fehler von $\pm$ o,39 bis $\pm$ o,98 γ berechnet wurde. Der Gehalt der Basen schien mit längerer Wachstumszeit abzusinken. In einem unvorhergesehenen Sonderfall waren alle Versuchspflanzen - sterile wie ATCC 4412 infizierte Kulturen - von Blattläusen befallen. Äußerlich zeigten alle diese Datura-Pflanzen im Blattverlust die gleiche Schädigung. Trotz der gewünschten Menge an Trockengewicht (2oo mg) konnten wir nach 15-tägiger Versuchsdauer bei den Azotobakter-freien Kulturen keine Alkaloide nachweisen. Die mit ATCC 4412 infizierten Pflanzen hingegen wiesen einen unerwartet hohen Gehalt jener Basen auf.

Alle Versuche fielen in die Zeit von August bis Februar. Die Rf-Werte der Substanzen betrugen: Atropinsulfat o,6, Hyoscyaminhydrobromid o,55, Scopolaminhydrobromid o,44.

Der Alkaloidgehalt einer Pflanze ist keineswegs konstant. WEHMER gibt für Blätter von Datura str. für das Hauptalkaloid Hyoscyamin ein Mengenverhältnis - bezogen auf das Trockengewicht - von o,329 - o,347 %, o,2 - o,6 %, meist o,3 - o,5 % an. Es liegt somit ein relativ großer Schwankungsbereich vor. Nach dem gleichen Autor wächst z.B. der Alkaloidgehalt mit Alter und Größe der Blätter, unabhängig von der Düngung. Er ist außerdem - wie bereits in eigenen Versuchen berücksichtigt und oben erwähnt wurde - morgens und in der Nacht am größten. Der Maximalwert fällt in die Blütezeit. Ein trockenes Aufbewahren der Proben von 1-2 Jahren soll andererseits ohne Einfluß sein.

Nach SHIPILENIA sinkt bei Datura nach der Knospenbildung der Alkaloidgehalt wesentlich von o,42o auf o,112 % herab.

Nach SOKOLOW wirken sich negativ auf Alkaloidgehalt aus: zunehmende Niederschläge - es wurde daher in eigenen Versuchen relativ trocken gearbeitet -, niedere Temperaturen. Positiven Einfluß haben Bor, Mangan, ein steigender pH-Wert von 4,3 bis 8,2. Nach seiner Ansicht scheinen sich ätherische Öle und Alkaloide auszuschalten.

Th.M.STIENSTRA (1954) führte sterile Wurzelkulturen von Datura stram. in völlig synthetischem Medium durch und fand eine Alkaloidabnahme von 25 % gegenüber normal gewachsenen Datura-Wurzeln.

Nach WEHMER (l.c.) vermindert Pilzbefall den Alkaloidgehalt.

G.SCHUSTER fand bei seinen Versuchen an verschiedenen Arten und Sorten der Gattung Nicotiana L. - infiziert mit dem Tabak-X-Virus-anfänglich eine beträchtliche Erhöhung gegenüber der Kontrolle: o,423 % gegenüber o,326 %. Die Infektion erfolgte nach 9 bzw. 8 Wochen, abgeerntet wurde nach 11 Wochen. Die Zunahme verringerte sich jedoch im Laufe der weiteren Entwicklung immer mehr, so daß der abschließend gemessene Alkaloidgehalt sogar unter dem der gesunden Pflanzen lag.

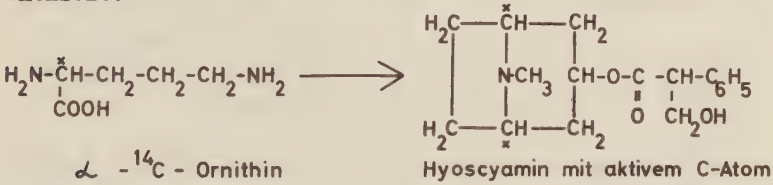
Was weiß man über die Synthese der Tropaalkaloide ?

JAMES und CROMWELL suchten als erste nach dem Bildungsweg dieser Alkaloide an der lebenden Pflanze.

JAMES machte Ernährungsversuche an isolierten jungen Atropablättern und beobachtete eine geringe Alkaloidzunahme nach Gabe von Arginin bzw. Ornithin zusammen mit Rohrzucker. Er schloß daraus, daß das Tropanskelett aus Arginin über Ornithin entstehe.

CROMWELL fand als weitere Zwischenstufe Putrescin. Nach Injektion sowohl von Arginin als auch von Putrescin in Atropa- bzw. Daturapflanzen war ein Alkaloidanstieg zu verzeichnen, während andere Aminosäuren keine Zunahme bewirkten.

LEETE, MARION, SPENSER bestätigten durch Isotopenversuche, daß Ornithin als Vorstufe der Tropaalkaloide in der Pflanze dienen kann. Sie führten mehrere Monate alten Datura-Pflanzen über die Wurzel α-^{14}C- Ornithin zu. Die Analyse nach 8 Tagen ergab radioaktives Hyoscyamin, das Aktivität auf die Brücken - C - Atome des Tropanringes verteilt enthielt.



α - ^{14}C - Ornithin

Hyoscyamin mit aktivem C-Atom in 1 und 5 im Tropinring

Das neben Hyoscyamin in der Versuchspflanze enthaltene Scopolamin zeigte sich völlig inaktiv. Hieraus schlossen die Verfasser auf getrennten Bildungsweg der beiden Alkaloide. Im Widerspruch hierzu konnte REINOUTS van HAGA bei Fütterungsversuchen an aseptischen Wurzelkulturen von Atropa Ornithin sowohl als Vorstufe von Hyoscyamin als auch von Scopolamin nachweisen.

CROMWELL nannte als gemeinsame Vorstufe einen $C_6 - C_7$ ungesättigten Tropankörper. FODOR mit seinen in-vitro-Versuchen konnte diese Annahme in neuester Zeit stützen. Die Synthese führte von Tropan-3,6-diol über 3,6-Tropenol.

Die Ergebnisse von ROMEIKE sprechen ebenfalls für einen gemeinsamen Syntheseweg. Datura ferox sei befähigt, Hyoscyamin in oberirdischen Teilen über ein Epoxyd in Scopolamin über-

zuführen. In den oberen Pflanzenteilen findet sich wirklich weitgehend Scopolamin, während in der Wurzel Hyoscyamin als Hauptalkaloid vorkommt.

Durch Pfropfungsversuche von Datura ferox-Reisern - praktisch alkaloidfrei - auf Cyphomandra-Wurzeln konnte bei künstlich zugeführter Hyoscyaminlösung nach 1o Tagen neben Hyoscyamin ein erheblicher Anteil von Scopolamin nachgewiesen werden. Die Fähigkeit blieb während der ganzen Lebensdauer - Pfropfungszeit - erhalten. Bei Atropa belladonna und Datura stram., innoxia und metel blieb bei entsprechender Versuchsanordnung der Erfolg aus.

HEGNAUER, ROMEIKE, INASEKI, MARION usw. stellten die verschiedensten Versuche zur Klärung dieses Problems an. Eindeutig weiß man noch immer nicht, ob lediglich eine Umwandlung von Hyoscyamin zur Bildung von Scopolamin führt, oder ob eine selbständige Synthese im Sproß erfolgt. Die verschiedensten Fütterungsversuche wurden durchgeführt, z.B. mit ^{15}N-Ammoniumsulfat, Methionin mit ^{14}C in Methylgruppe usw.

Ein Beispiel soll noch erwähnt werden, das eine Alkaloidbildung über Aminosäuren und einfache Peptide zeigt. EVONS und PARTRIDGE unternahmen Fütterungsversuche mit Glycin-2-^{14}C. In den ersten 8 Tagen nach Zugabe wurde Aktivität in Aminosäuren und einfachen Peptiden gefunden; nach 9 Tagen war jedoch keine radioaktive Aminosäure mehr erhalten; 3o-4o Tage nach Versuchsbeginn ließen sich radioaktives Scopolamin und Meteloidin nachweisen.

Auch HINDRA, SYROVY, BÖSWART nahmen Aminosäuren als potentielle Vorstufen der Alkaloide an, die entweder beim Eiweißzerfall entstehen oder in der Pflanze synthetisiert werden.

SCHÖPF nannte als Ornithin-Vorstufe Δ_1-Pyrrolin und Δ_1-Piperidin als eine solche für Lysin.

LEETE, MARION, SPENSER vermuten einen Zusammenhang zwischen Tryptophan und Nikotinsäure bzw. Anthranilsäurederivaten auch für die höhere Pflanze. Beim tierischen Organismus ist dies bereits bekannt und wurde ebenso in saprophytischer Kultur von Claviceps purpurea festgestellt (TYLER, SCHWARTERING).

GRÖGER und MOTHES fanden bei Roggenpflanzen und claviceps purpurea, daß verschiedene, injizierte Aminosäuren keine qualitative Veränderung des Alkaloidgehaltes hervorriefen, lediglich Tryptophan ließ quantitativ eine geringe Zunahme erkennen.

Andererseits sei auch PÖHM erwähnt, der durch Zugabe verschiedener Aminosäuren niemals eine Steigerung in der Biogenese von Mutterkornalkaloiden an saprophytischen Kulturen des Pilzes nachweisen konnte.

Die verschiedenen Wege einer etwaigen Synthese der Alkaloide wurden an dieser Stelle relativ ausführlich dargelegt, da wir in der Diskussion auf diese Frage nochmals zurückkommen.

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, wie wenig sich auch heute noch über die eigentliche Funktion der Alkaloide aussagen läßt.

Bei Veratrum und Aconitum will man in Alkaloidreichtum einen Schutz gegen Tierfraß in der Nähe von Sennhütten sehen.

In der Züchtungspraxis an der Tollkirsche zeigte eine dauerhafte Auslese solcher hochalkaloidhaltiger Formen und Festigung dieser Eigenschaft in der Nachkommenschaft gute Erfolge; die Deutung erscheint sehr "ad hoc", doch ist unter Umständen Selektionswert vorhanden.

Bei Lupinen erwies sich der Alkaloidgehalt ebenfalls als erblich. Ein Fehlen dieser Basen machte sich in größerer Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen bemerkbar. Bei Lupinus luteus zeigten sich alkaloidarme Formen in ihrer Vitalität nicht immer geschwächt. Bei Datura-Selektionierungen konnte man sogar die Erfahrung machen, daß mit steigendem Alkaloidgehalt die Vitalität sank. MOTHES will in Alkaloiden einen zwar lebenswichtigen Stoff sehen, dessen Anhäufung aber schädliche Folgen haben kann. Alkaloide in geringer Konzentration seien weit verbreitet. Dies hätten sie mit den Cumarinen gemeinsam. Nach MOTHES haben Alkaloide und Cumarine auf den Wuchsstoffanstieg Einfluß (RAMSHORN).

Arbeiten von IZARD in BERGERAC weisen in gleiche Richtung. Nikotin soll in seinen Versuchen synergistisch oder auch antagonistisch mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (ß-Indoylessigsäure) wirken.

In vitro konnten POLONOVSKY und Mitarbeiter Aminooxyde verschiedener Alkaloide, wie Atropin, Scopolamin, Physostigmein herstellen, die POLONOVSKY "Geno-Alkaloide" nannte. Durch die N-Oxydation stellte er eine bedeutende Entgiftung fest.

Könnten diese Stoffe auch im Organismus selbst nachgewiesen werden, so wären wir dem Problem der Toxizität bei höherer Konzentration der Alkaloide für die Pflanze selbst bereits einen Schritt näher gekommen.

Abschließend kann gesagt werden, daß für die Alkaloidbildung nicht nur die Umwelt der Pflanze - einschließlich der Mikroflora in der Rhizosphäre - von Bedeutung ist, sondern auch ihre genetische Konstitution. Intensive Versuche in dieser Richtung wurden am Mutterkorn in Gatersleben durchgeführt.

3. Teil

Einfluß der Alkaloide Atropinsulfat, Hyoscyaminhydrobromid und Scopolaminhydrobromid auf verschiedene Azotobakterstämme

Material und Methodik.

In unseren Versuchen verwendeten wir folgende Bakterienkulturen :

ATCC 4412 (Sammlung Botanisches Institut, München)
"Datura Wien" (selbst isoliert)
"Solanum nigrum" (selbst isoliert)

Die Bakterienstämme wurden laufend auf Mannit-Agar-Schrägröhrchen weitergezüchtet und wiederholt mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft.

Die Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung:

1ooo ccm Leitungswasser; 2o g Mannit; 1 g $CaCO_3$; o,5 g K_2HPO_4; o,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; o,o5 g $FeSO_4$; 1 ml einer o,o5 %igen Lösung Na_2MoO_4.

Der feste Nährboden enthielt außerdem noch 18-2o g gewöhnlichen, ungelösten Agar.

Als Anzuchtgefäße dienten 1 Liter Erlenmeyer-Enghalskolben mit 25o-33o ccm Flüssigkeit. Diese blieben ständig auf einer Schüttelmaschine in einer Dunkelkammer mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 21-22°C.

Zu den Hauptversuchen verwendeten wir ausschließlich 5o ml Enghalskölbchen, die wir zunächst leer im Dampftopf sterilisierten und anschließend trockneten. In diesen lösten wir die gewünschte Alkaloidmenge in 1 ml sterilem Leitungswasser und fügten 19 ml Bakteriensuspension hinzu, schüttelten gut durch und brachten die jeweilige Kölbchenserie mit 2o ml Inhalt auf die Schüttelmaschine zurück.

1. Wachstum

Die Wachstumszunahme wurde alle 24 Std. nephelometrisch mit einem Kolorimeter (Typ LANGE Universal) mit Blaufilter und bei völlig geöffneter Blende gemessen (1 ml Küvette).

2. Atmung

Die Bestimmung der Atmungswerte erfolgte in der WARBURG-Apparatur (Fa. Braun-Melsungen) mit jeweils 3 ml Bakteriensuspension - einer genau bestimmten Extinktion - und im Nebengefäß o,3 ml einer lo%igen Kalilauge mit gefalteter Filtereinlage als CO_2-Absorber.

3. Trockengewichtsbestimmung

Wir konnten trotz hochtouriger Zentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 15000 U/min. bei der z.T. sehr starken Schleimbildung nur eine relativ klare und schleimfreie Flüssigkeit abgießen. Der Rückstand wurde in Wägegläschen bei ca. 8o°C getrocknet.

4. Stickstoffbestimmung

Die Stickstoffbestimmungen führten wir nach der Methode von KJEIDAHL - Mikromethode nach PARNAS-WAGNER - durch. Hierzu verwendeten wir jeweils 5 ml einer sehr dichten Bakterienkultur und veraschten diese mit 2 ml H_2SO_4 konz. p.A.

5. Viskosität

Die Viskositätsbestimmung erfolgte in der Dunkelkammer mit konstanter Raumtemperatur, in der sich die Kölbchen auf der Schüttelmaschine befanden. Wir bestimmten mit Stoppuhr bei schwachem Rotlicht die Ausflußdauer der Bakteriensuspension gegenüber Leitungswasser.

6. Melaninbildung

Nach längerer Kulturdauer zeigt sich ein immer deutlicher werdender brauner Farbton in der Bakteriensuspension. Die Zeit bis zur deutlichen Melaninbildung wurde festgestellt.

Versuchsergebnisse

Die drei Azotobakterstämme unterschieden sich - bereits makroskopisch auf der Plattenkultur sichtbar - in ihrer Wuchsform. Während der "Datura Wien-Stamm" und ATCC 4412 im Anfangsstadium deutlich voneinander abgesetzte Kolonien bildeten, zeigte der "Solanum nigrum-Stamm" bereits nach 2 Tagen eine zusammenhängende, fast glatte Schicht auf der Agar-Kultur. Das mikroskopische Bild ergab für den letzteren Bakterienstamm sehr kleine Stäbchen, während "Datura-Wien" dem Typ ATCC 4412 phänotypisch zu entsprechen schien.

Wie weit dieses äußerlich gleiche bzw. verschiedene Aussehen auch für das physiologische Verhalten gilt, soll in folgenden Abschnitten geklärt werden.

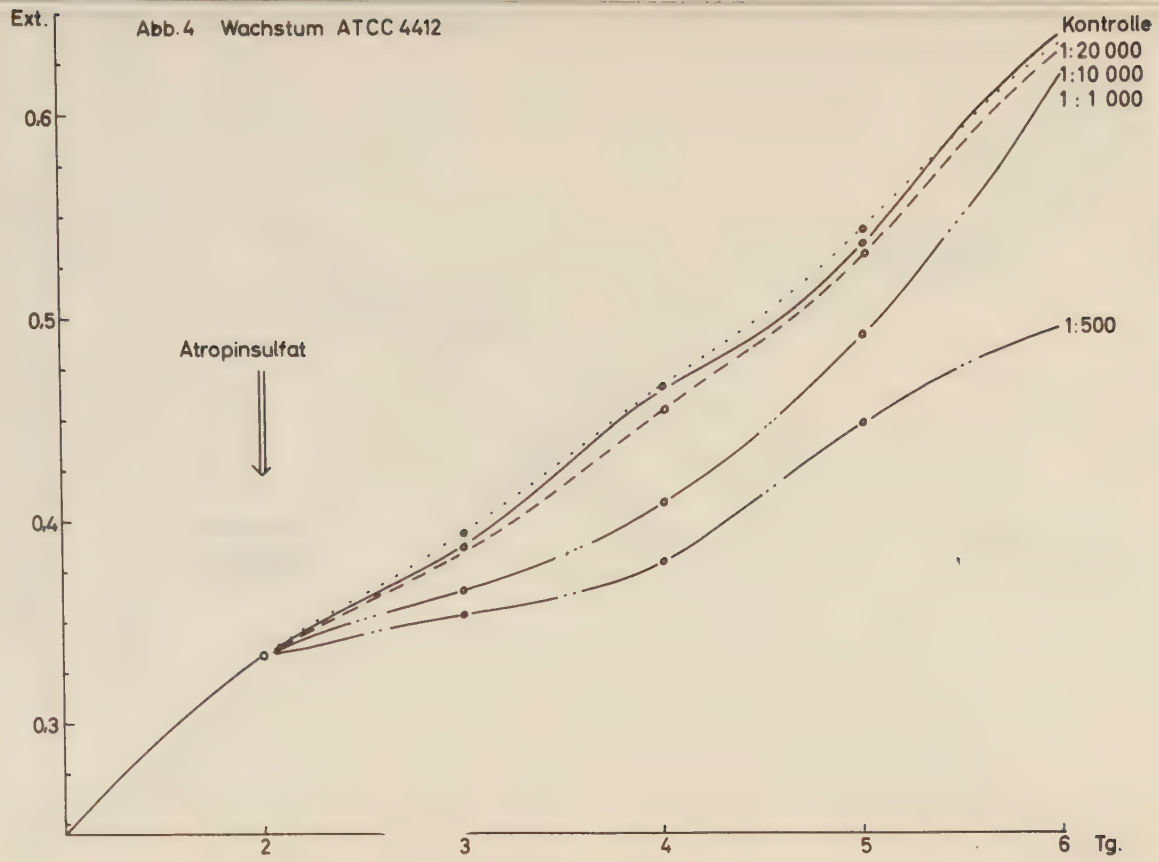
1. Wachstum

Sobald die Bakteriensuspension einen Extinktionswert von o,3 bis o,4 - ca. 2 Tage nach Beimpfung - zeigte, begann der eigentliche Versuch. Nach Zugabe der einzelnen Alkaloide in den verschiedenen Konzentrationen 1:2o ooo, 1:1o ooo, 1:1ooo, 1:5oo wurde alle 24 Std. die Wachstumszunahme gemessen. Da die Alkaloidlösungen farblose Flüssigkeiten darstellen, wird durch sie der Extinktionswert nicht verändert.

An Hand der Wachstumskurven (Abb. 4-12) wird deutlich, daß die neuen Bedingungen - geringeres Volumen in kleinerem Gefäß - ohne Einfluß bleiben. Die Kontrollen wachsen gleichmäßig weiter.

Die geringen Zugaben von Atropinsulfat, Hyoscyamin oder Scopolaminhydrobromid in den Verdünnungen 1:2o ooo und 1:1o ooo wirken sich nicht aus. Für die beiden höheren Konzentrationen gilt das gleiche lediglich bei dem "Solanum-nigrum-Stamm" : er zeigte sich sozusagen indifferent gegenüber den gebotenen Alkaloiden. Anders jedoch verhielten sich ATCC 4412 und "Datura-Wien". Atropinsulfat rief bei beiden in der Konzentration 1:5oo eine deutliche Hemmung hervor, während 1:1ooo nach mehrtägiger Einwirkung eine Tendenz zur Adaptation zeigte. Entsprechende Ergebnisse erhielten wir für Hyoscyaminhydrobromid. Bei Scopolamin lagen die Verhältnisse nicht so klar. Bei der Mehrzahl der Versuche bewirkte die relativ hohe Konzentration 1:5oo sogar eine geringe Förderung oder zeigte nur unwesentliche Abweichung gegenüber der Kontrolle.

Vergleichen wir abschließend die Wachstumskurven von ATCC 4412 und Datura-Wien so können wir sagen: grundsätzlich zeigen beide Bakterienstämme ähnliches Verhalten den verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Alkaloide gegenüber. Jedoch sind die Unterschiede bei ATCC 4412 im ganzen etwas krasser. Wir können somit die Ansicht von METZ unterstützen: Mikroorganismen aus der Rhizosphäre bestimmter Pflanzen scheinen gegen jene Wurzelausscheidungen ziemlich widerstandsfähig zu sein. Unser an Datura-Samen isolierter Bakterienstamm ist für die Salze der in dieser Pflanze vorkommenden Hauptalkaloide etwas unempfindlicher als ATCC 4412.


Ext.
Abb. 4 Wachstum ATCC 4412
Kontrolle
1:20 000
1:10 000
1 : 1 000
1:500
Atropinsulfat
0.6
0.5
0.4
0.3
2
3
4
5
6
Tg.

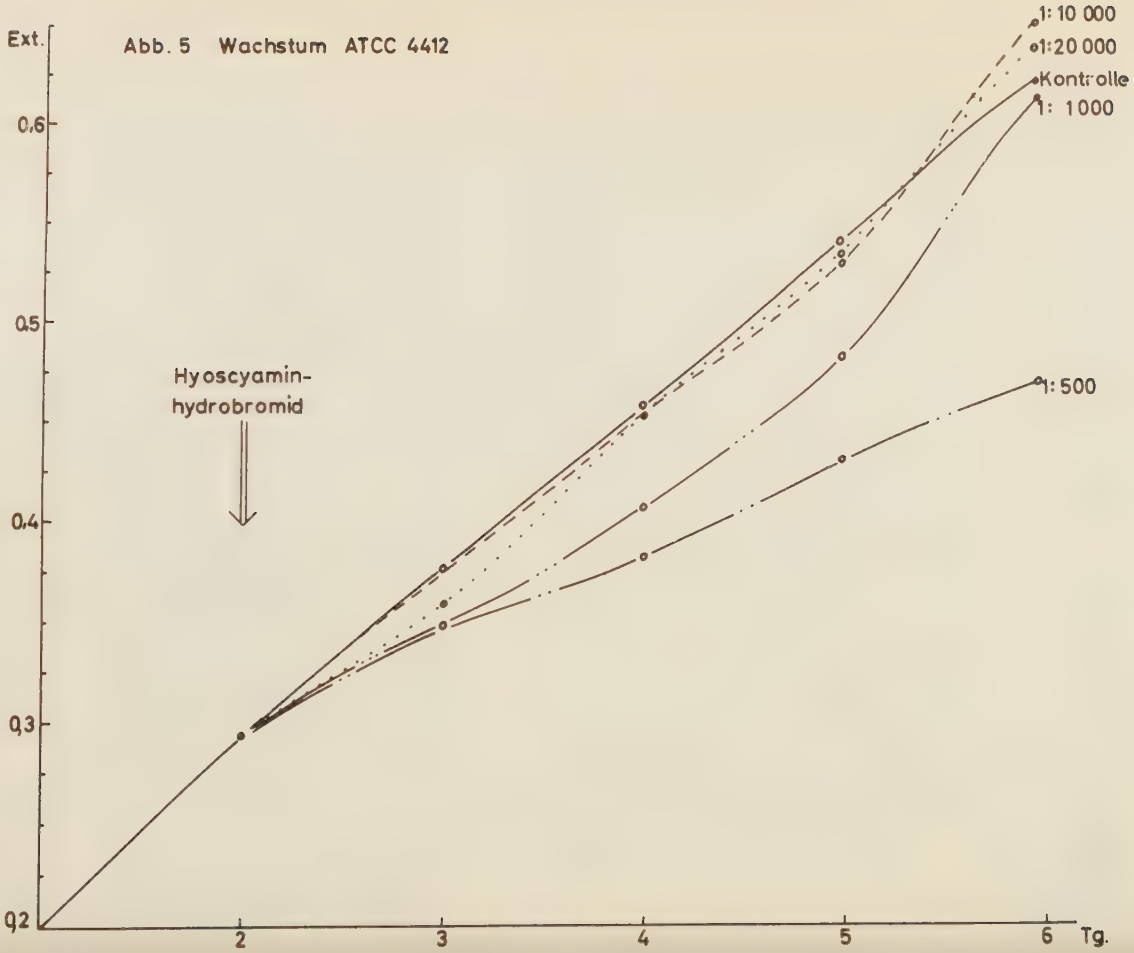


Abb. 5 Wachstum ATCC 4412
Ext.
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
Hyoscyamin-
hydrobromid
1: 10 000
1:20 000
Kontrolle
1: 1000
1: 500
2
3
4
5
6
Tg.

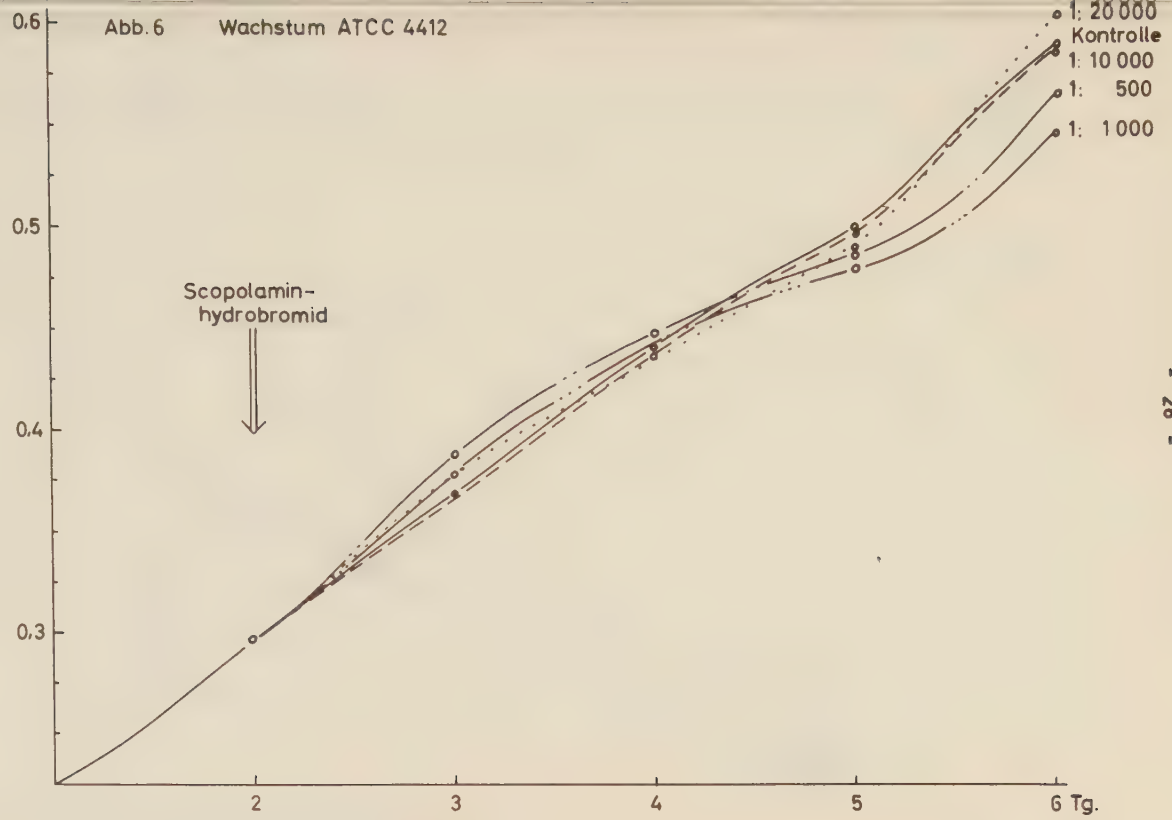
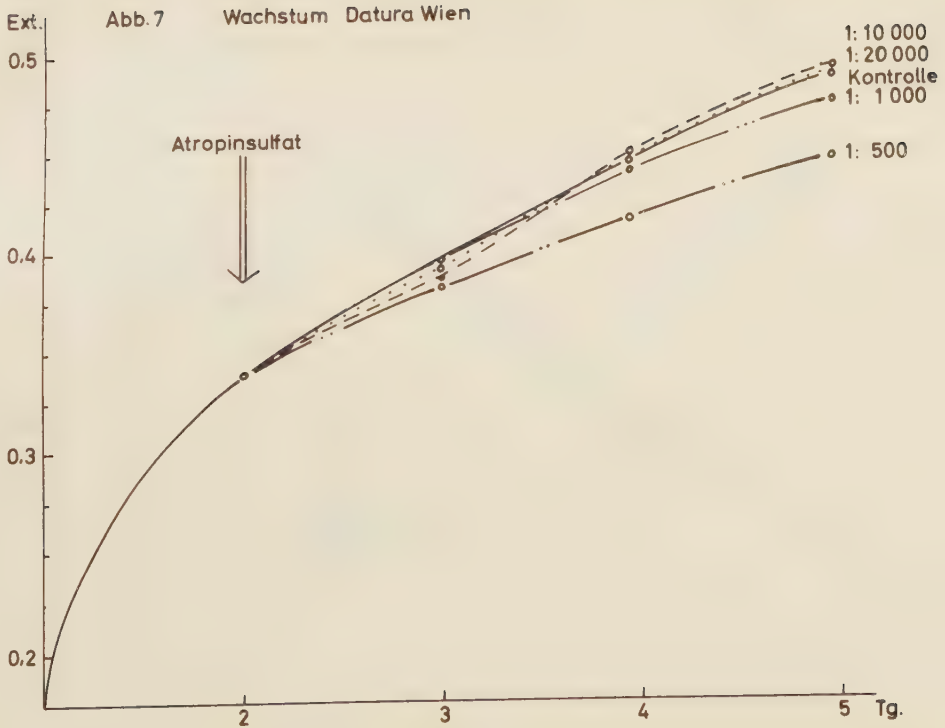
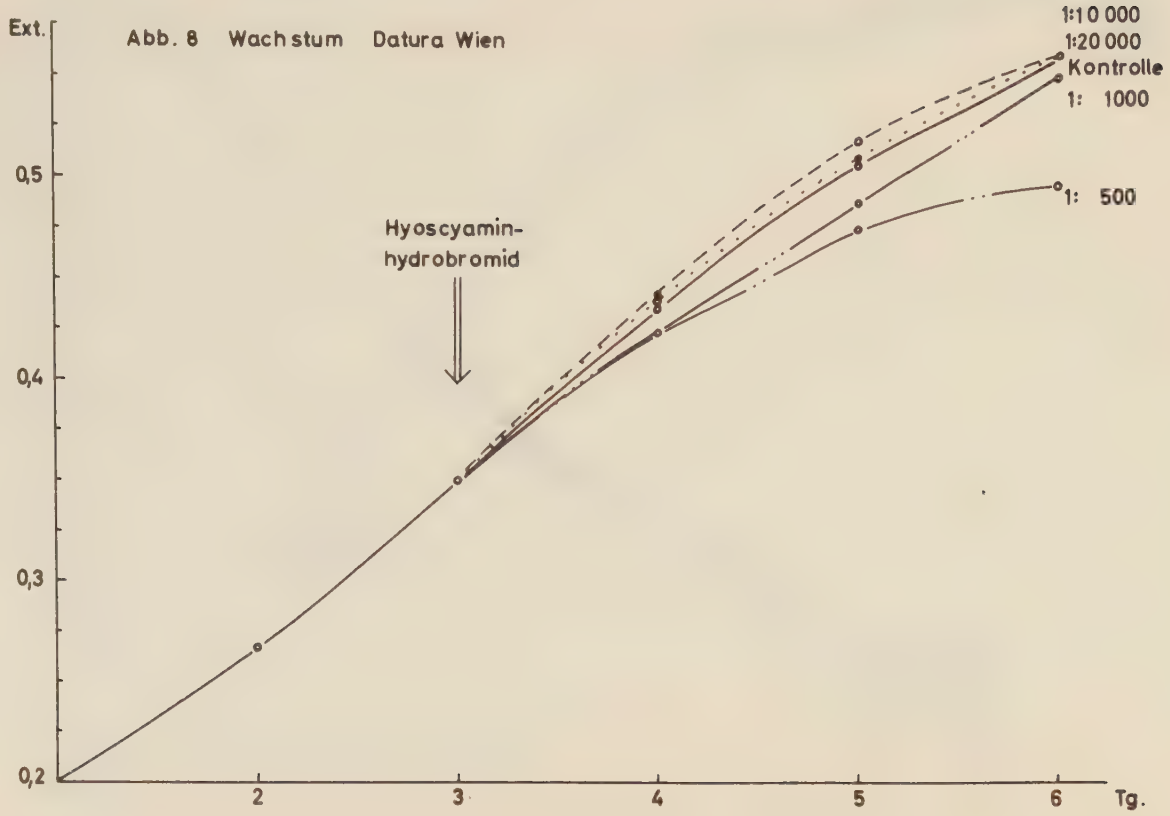


Abb. 6 Wachstum ATCC 4412
0,6
0,5
0.4
0.3
Scopolamin-
hydrobromid
1: 20 000
Kontrolle
1: 10 000
1: 500
1: 1 000
2
3
4
5
6 Tg.


Ext.
Abb. 7
Wachstum Datura Wien
0.5
0.4
0.3
0.2
Atropinsulfat
1: 10 000
1: 20 000
Kontrolle
1: 1 000
1: 500
2
3
4
5
Tg.


Ext.
Abb. 8 Wachstum Datura Wien
1:10 000
1:20 000
Kontrolle
1: 1000
1: 500
Hyoscyamin-
hydrobromid
0,5
0,4
0,3
0,2
2
3
4
5
6
Tg.

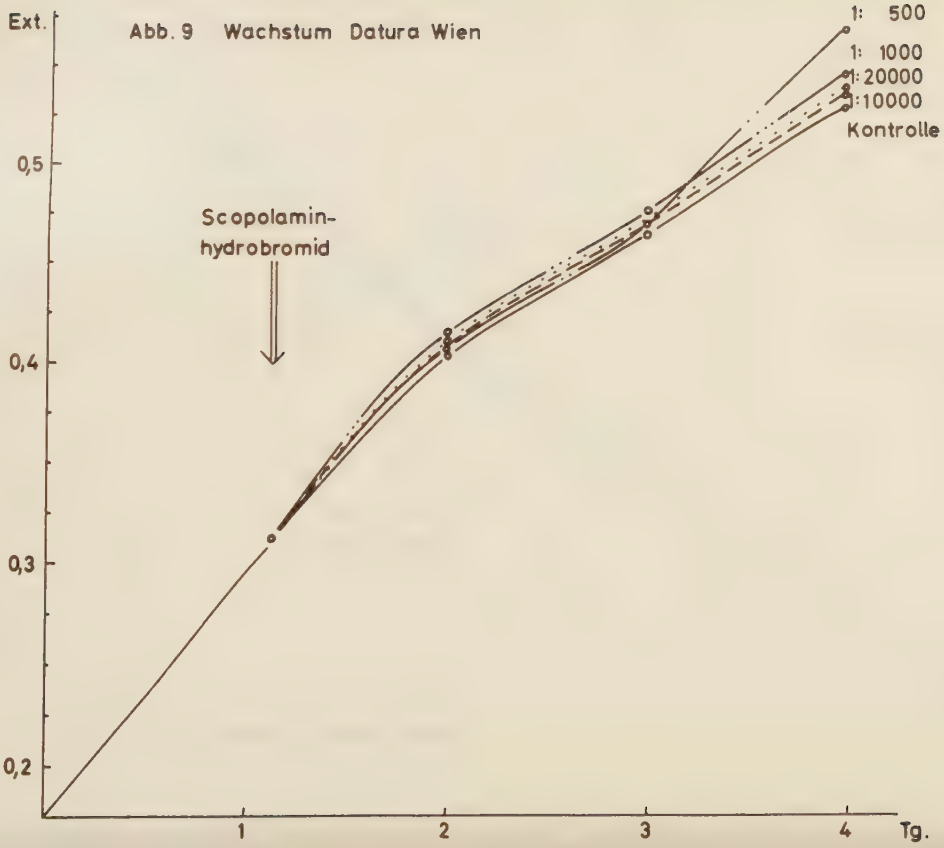
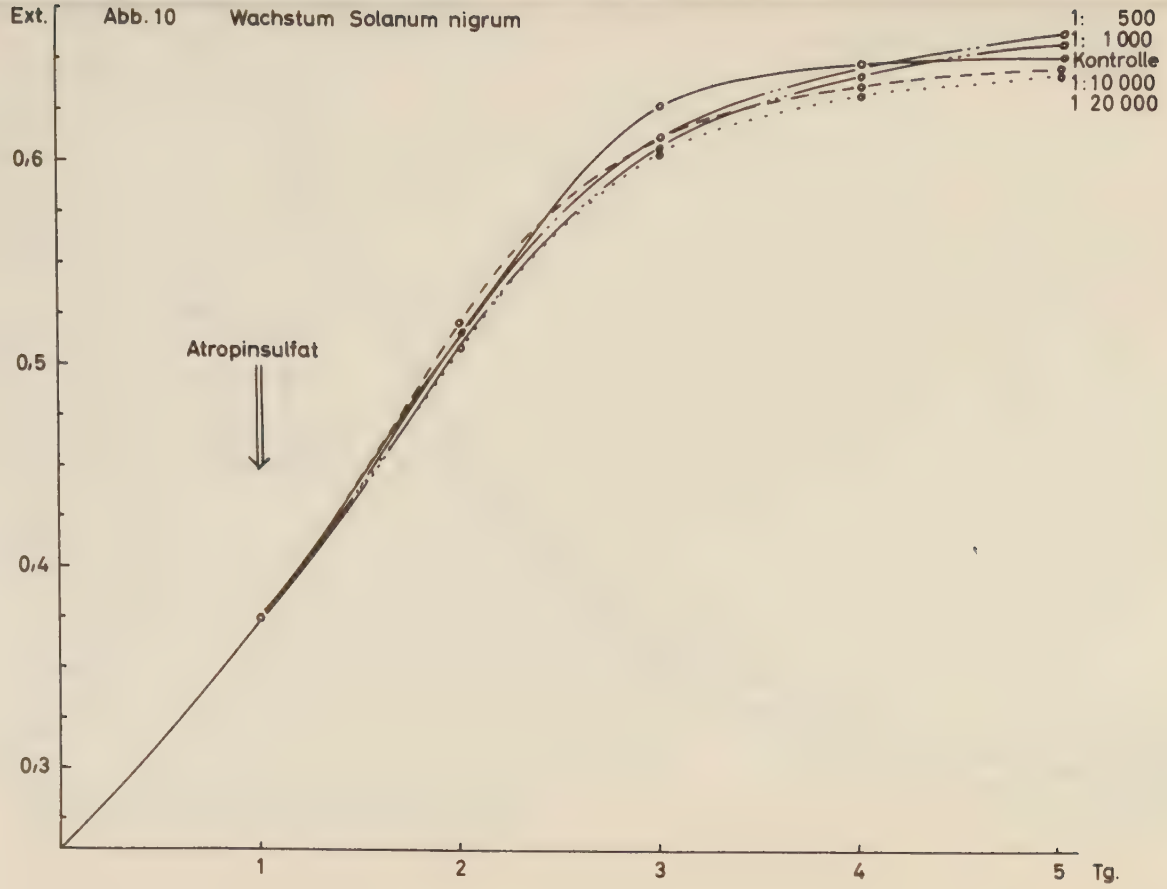
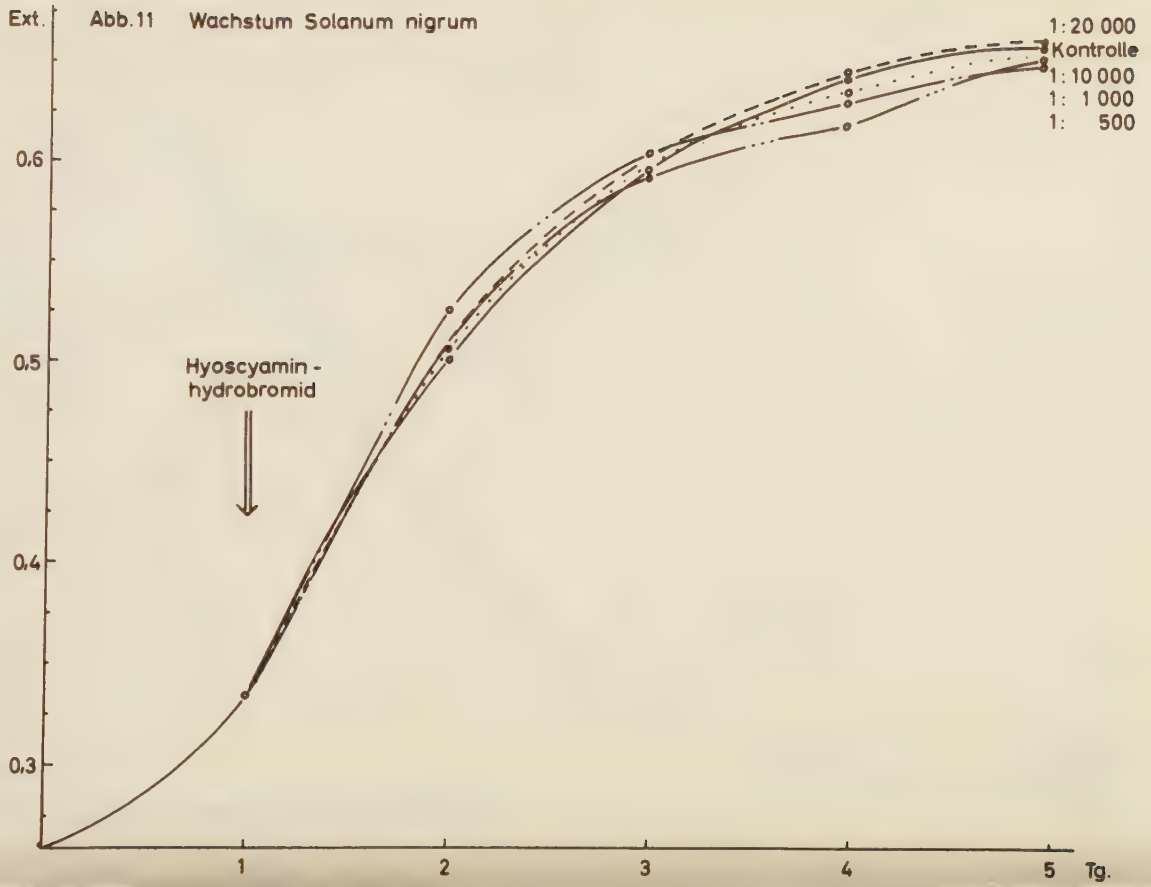


Abb. 9 Wachstum Datura Wien
Ext.
0,5
0,4
0,3
0,2
Scopolamin-
hydrobromid
1: 500
1: 1000
1:20000
1:10000
Kontrolle
1
2
3
4
Tg.


Ext.
Abb. 10 Wachstum Solanum nigrum
1: 500
1: 1 000
Kontrolle
1:10 000
1 20 000
0,6
0,5
0,4
0,3
Atropinsulfat
1
2
3
4
5
Tg.


Ext.
Abb.11 Wachstum Solanum nigrum
1:20 000
Kontrolle
1:10 000
1: 1 000
1: 500
0.6
0.5
0.4
0.3
Hyoscyamin -
hydrobromid
1
2
3
4
5
Tg.

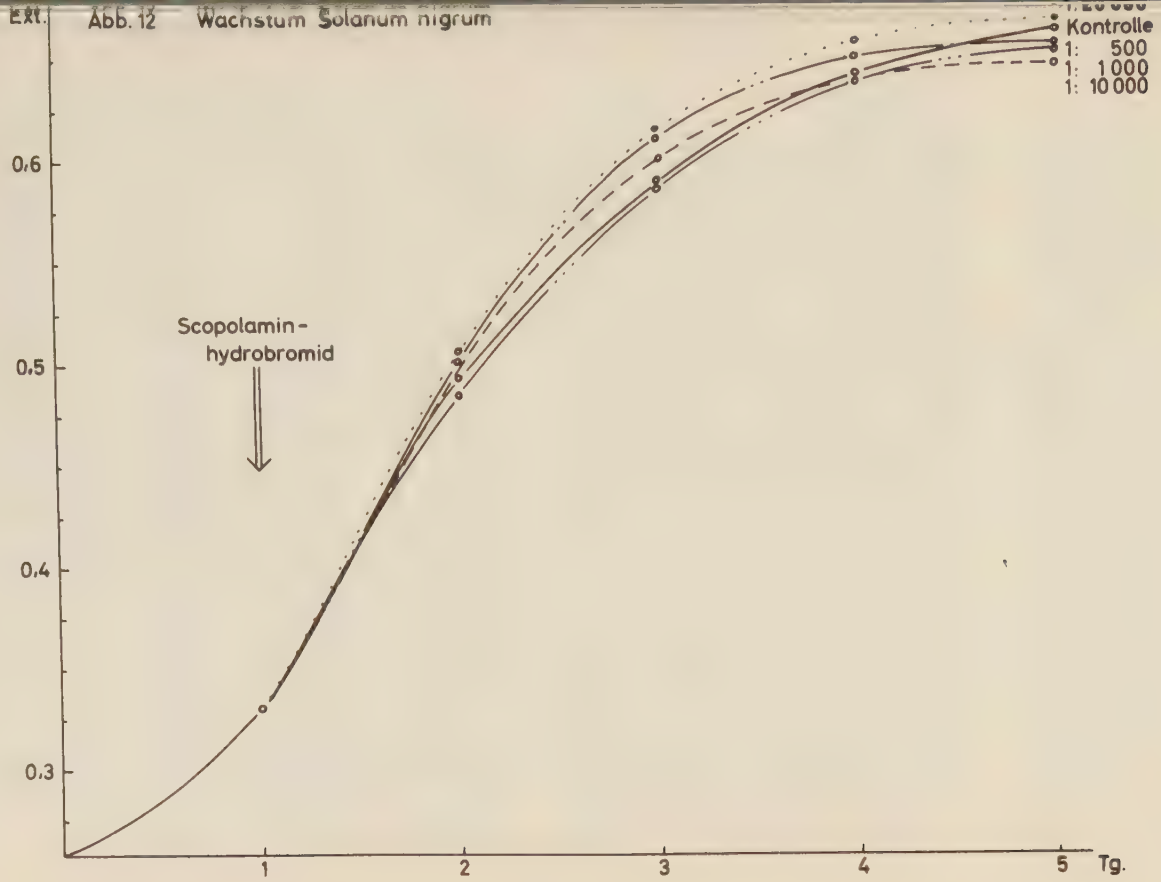


Abb. 12 Wachstum Solanum nigrum

2. Atmung

Da in den Wachstumsversuchen die Konzentrationen 1:2o ooo und 1:1o ooo auf die Bakterienstämme in allen drei Fällen unwirksam blieben, beschränkten wir uns bei den folgenden Versuchen auf die höheren Konzentrationen 1:1ooo und 1:5oo (Abb. 13-2o).

Bei ATCC 4412 und Datura-Wien fanden wir nach mehrtägiger Alkaloideinwirkung - die Resultate ändern sich nicht wesentlich, ob es sich um 4o, 6o, 9o oder 12o Std. handelt , wie in zahlreichen Versuchen geprüft wurde - eine geringe Förderung in den Atmungswerten. Auch hier zeigte sich erneut ATCC 4412 etwas empfindlicher gegenüber den zugesetzten Stoffen. Scopolamin wirkte sich nur sehr gering aus. Bei mehreren Versuchen wurde gerade der Zeitpunkt erreicht, in dem die Atmungskurve des jeweils untersuchten Bakterienstammes rasch abfiel. Die Resultate waren unterschiedlich. Einmal sank sehr rasch die O_2-Abgabe bei der Kontrolle, das andere Mal waren es die Kulturen mit Alkaloidzusatz, die schließlich kaum noch atmeten.

Unser dritter Bakterienstamm "Solanum nigrum" zeigte sich auch in der Atmung bei einer Alkaloidzugabe in der hohen Konz. 1:5oo indifferent. 1:1ooo hingegen führte erstaunlicher Weise zu einer schwachen Hemmung.

Im Allgemeinen gilt die Regel, daß mit gesteigertem bzw. vermindertem Wachstum sich der Atmungswert ebenfalls meist vergrößert bzw. verkleinert.

Bei ATCC 4412 und Datura Wien fanden wir jedoch das Gegenteil - trotz geringeren Wachstums geförderte Atmung.

Abb. 13 Atmung ATCC 4412

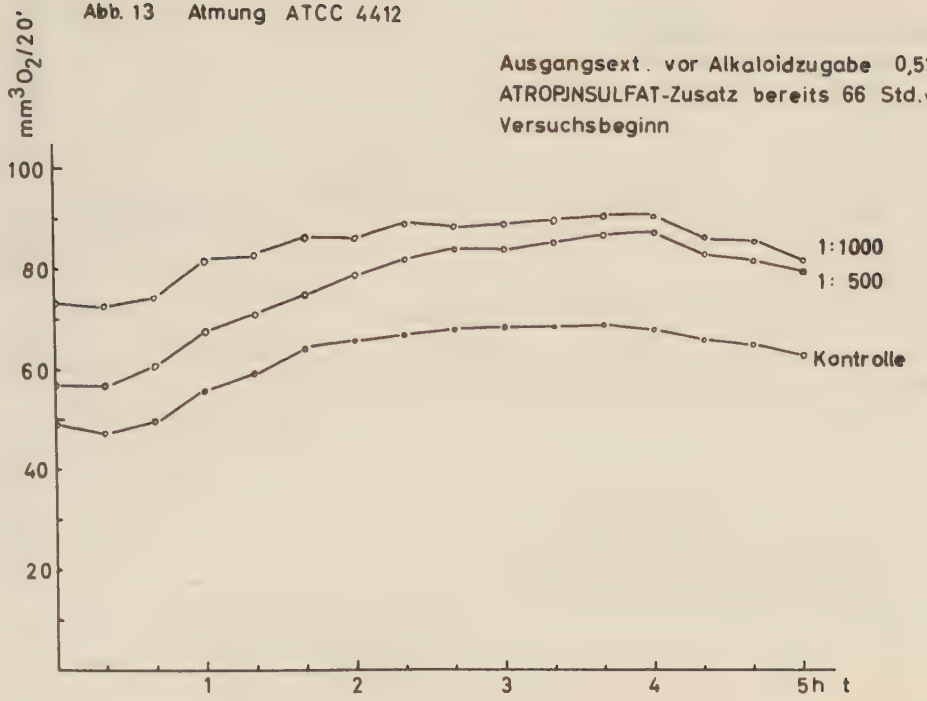


Abb. 14 Atmung ATCC 4412

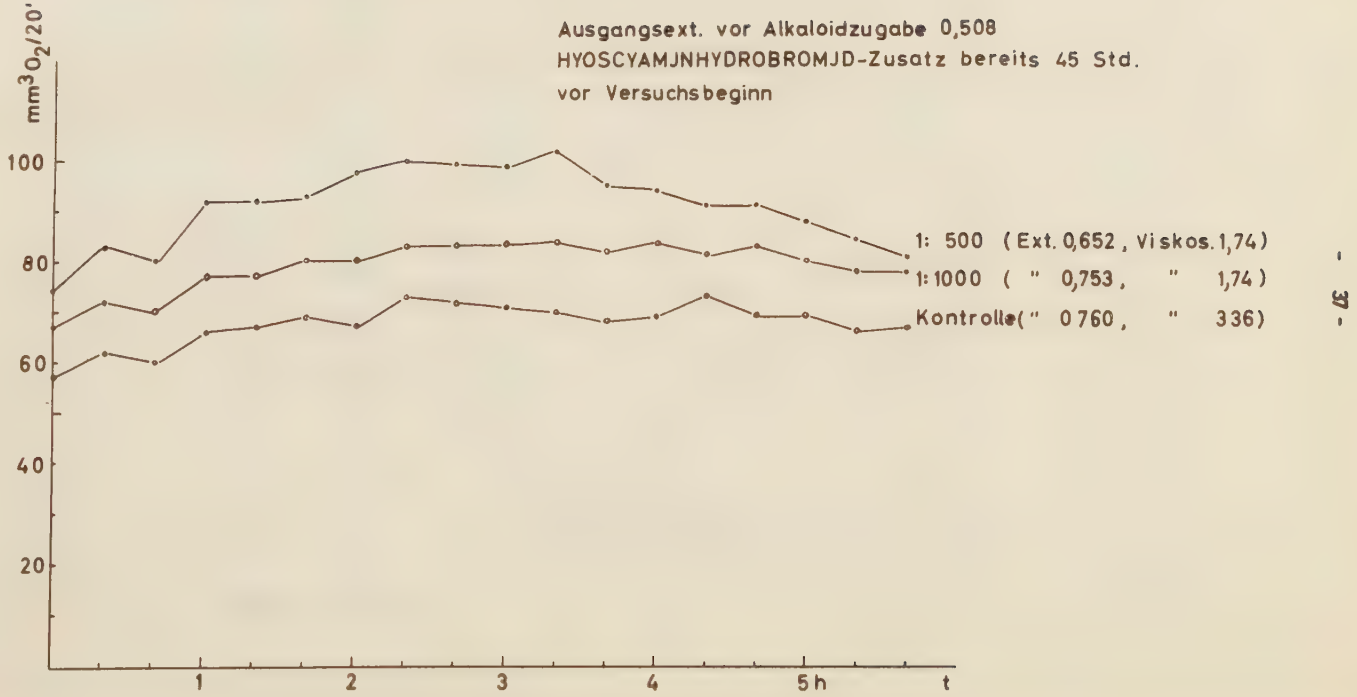


Abb. 15 Atmung ATCC 4412

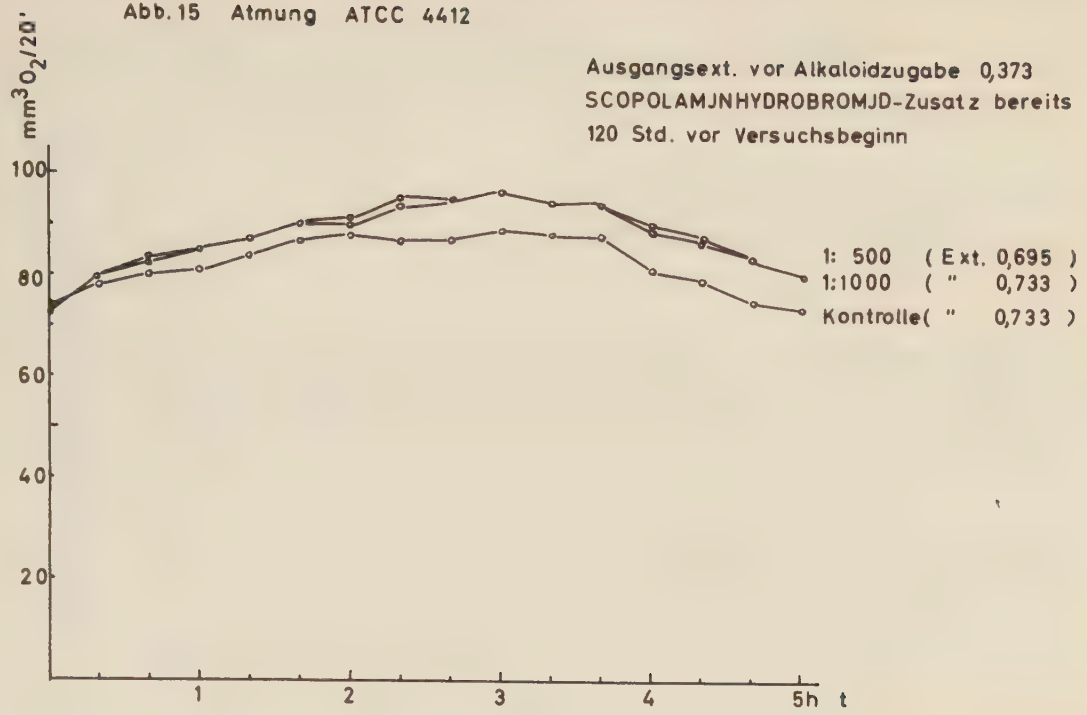


Abb. 16 Atmung Datura Wien

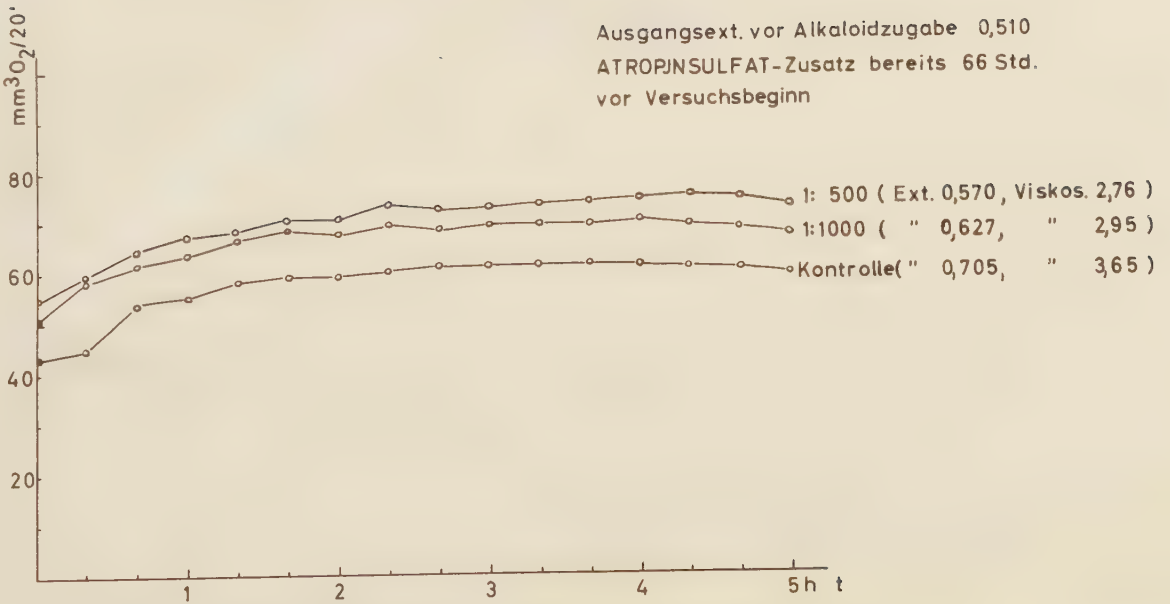


Abb. 17 Atmung Datura Wien

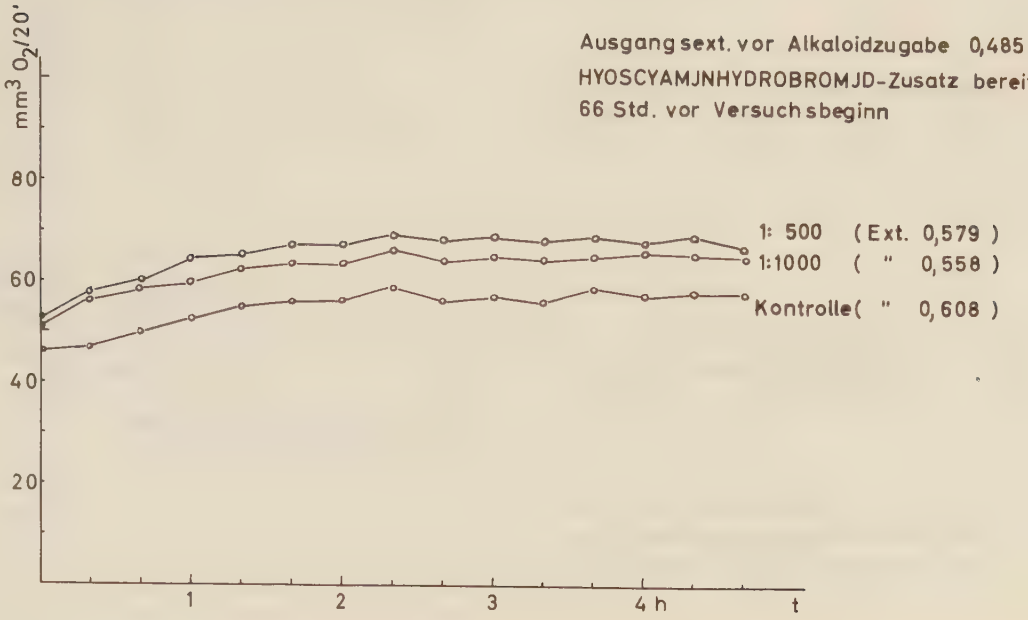


Abb. 18 Atmung Datura Wien

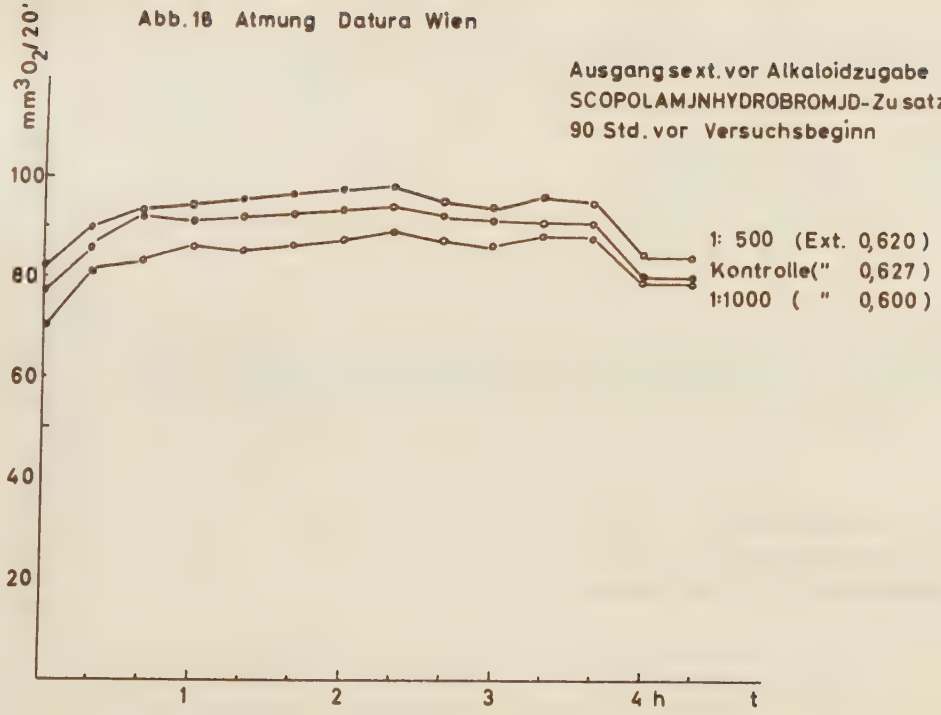


Abb. 19 Atmung Solanum nigrum

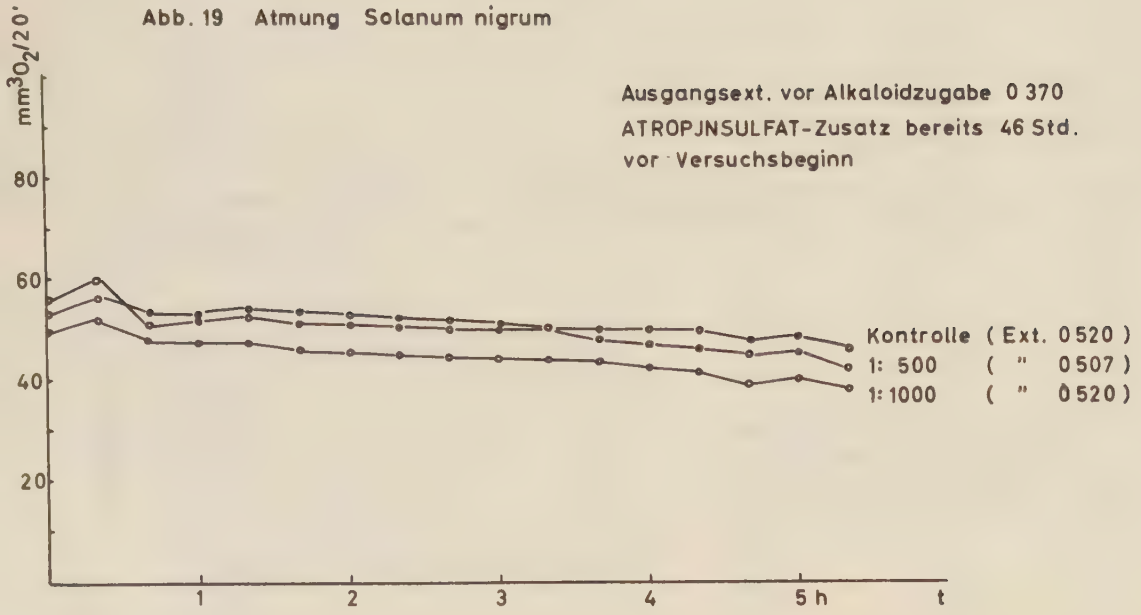
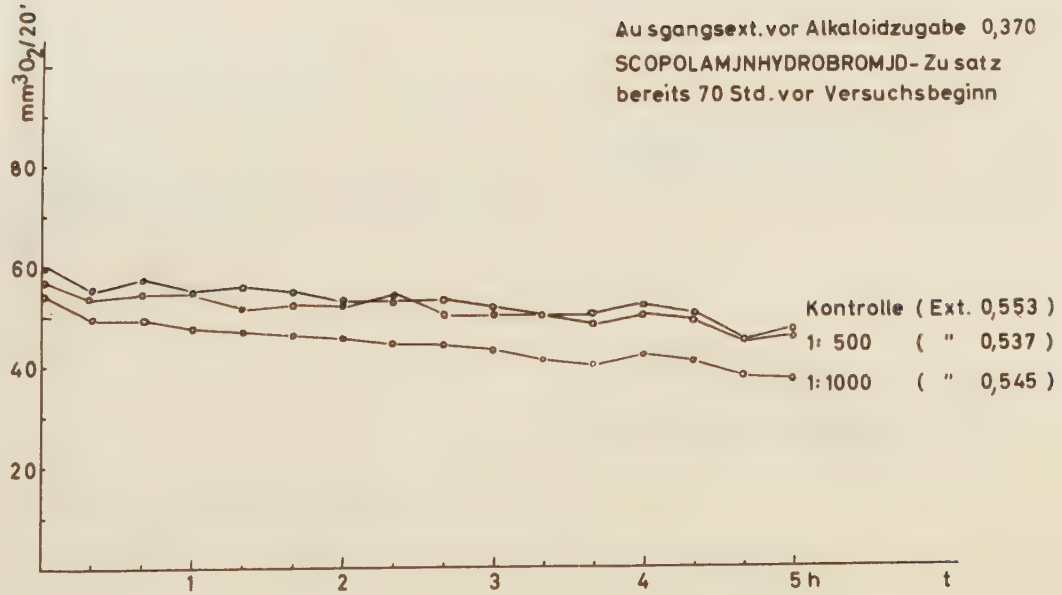


Abb. 20 Atmung Solanum nigrum



MEYERHOF und BURK (1928) und BURK (1930) versuchten an anderen Objekten dieses Phänomen folgendermaßen zu deuten. Nach ihrer Ansicht wird bei langsamerem Wachstum mehr der vorhandenen Menge der C-Quelle in Betriebs- oder Nebenstoffwechsel, der sich z.B. bei Torula bei den niedrigsten Belüftungsintensitäten als anaerobe Alkoholbildung zeigt, verbraucht und steht somit weniger für den Aufbau von Zellsubstanz zur Verfügung.

Es wäre auch daran zu denken, daß durch die Alkaloide eine teilweise Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung erfolgt; so kommt es zu einem "Atmungsleerlauf" ohne entsprechende Bereitstellung von Vermehrungsenergie.

Wir wollen zunächst die weiteren Ergebnisse erörtern, um anschließend in größerem Zusammenhang - bei Besprechung der Viskosität - auf dieses Problem nochmals zurückzukommen.

3. Trockengewichtsbestimmung

Die Trockengewichtsbestimmungen liefen den Wachstumsergebnissen parallel und bestätigten die Tatsache, daß bei höheren Alkaloidzugaben von Atropinsulfat die Eiweißbildung bei ATCC 4412 und Datura-Wien verringert war.

	ATCC 4412	Dat. Wien	Sol. nigr.
Kontrolle	100 %	100 %	100 %
At. 1:1000	74,4 %	73,6 %	92,2 %
At. 1: 500	63,4 %	46,2 %	107,7 %

ATCC 4412 : Ausgangsext. 0,408 ; Alkaloideinwirkung 4 Tage
Dat.-Wien : Ausgangsext. 0,331 ; Alkaloideinwirkung 5 Tage
Sol. nigr.: Ausgangsext. 0,408 ; Alkaloideinwirkung 4 Tage

4. Stickstoffbestimmung

Auch der verminderte Stickstoffgehalt gegenüber der Kontrolle bei höheren Atropin und Hyoscyaminkonzentrationen sprach für die Richtigkeit der Wachstumsbefunde. Scopolamin wirkte sich hier - wie auch in den Wachstumsversuchen - teilweise der Kontrolle gegenüber sogar fördernd aus.

Bei Solanum nigrum lagen nur geringe Differenzen vor. Die schwach geförderte Eiweißbildung bei einer Konz. von 1:5oo fand sich ebenfalls bei einer Bestimmung des Stickstoffgehaltes wieder. In den Wachstumsversuchen konnten wir keinen eindeutigen Effekt erzielen.

a) ATCC 4412

mg	Kontrolle	Atropinsulfat		Scopolamin-hydrobromid	
		1:1ooo	1:5oo	1:1ooo	1:5oo
N-gesamt	o,7368	o,7o88	1,o842	o,8265	1,4oo8
N-Alkaloid	-	o,188	o,376	o,181	o,362
N-Bakt.	o,7368	o,52o8	o,7o82	o,6455	1,o388

mg	Kontrolle	Hyoscyamin-hydrobromid		je 5 ml Bakteriensuspension
		1:1ooo	1:5oo	
N-gesamt	o,784o	o,812o	o,868o	Alkaloideinwirkung: Atropin u.Scopolamin 7 Tage; Ausgangsext.o,373
N-Alkaloid	-	o,189	o,378	
N-Bakt.	o,784o	o,623o	o,49oo	Alkaloideinwirkung: Hyoscyamin 5 Tage; Ausgangsext.o,331

Ausgehend von einer bestimmten Trockenmasse, erhielten wir umgerechnet auf 1 mg Bakterienmasse für Kontrolle wie für Versuche mit Atropinzusatz in einer Konzentration von 1:1000 und 1:500 jeweils ca. 0,03 mg N - 4 Tage Alkaloideinwirkung bei Ausgangsext. 0,408 - . Somit darf obiger Abweichung bei Atropinzusatz - 1:1000 empfindlicher als 1:500 - keine besondere Bedeutung beigemessen werden.

b) Stamm Datura-Wien

mg	Kontrolle	Atropinsulfat	
		1:1000	1:500
N-gesamt	0,760	0,598	0,736
N-Alkaloid	-	0,188	0,376
N-Bakt.	0,760	0,410	0,360

Alkaloideinwirkung 6 Tage: Ausgangsext. 0,331
je 5 ml Bakteriensuspension

mg	Kontrolle	Hyoscyaminhydrobromid	
		1:1000	1:500
N-gesamt	1,1823	1,0450	0,9385
N-Alkaloid	-	0,189	0,378
N-Bakt.	1,1823	0,8560	0,5605

Alkaloideinwirkung 9 Tage; Ausgangsext. 0,385
je 5 ml Bakteriensuspension

Ausgehend von bestimmtem Trockengewicht, betrug der N-Gehalt, umgerechnet auf 1 mg Bakterienmasse bei einer Ausgangsext. von 0,331 und nach 6-tägiger Atropinsulfateinwirkung, 0,04 mg.

c) Stamm Solanum nigrum

mg	Kontrolle	Hyoscyaminhydrobromid		Scopolaminhydrobromid	
		1:1000	1:500	1:1000	1:500
N-gesamt	0,4399	0,5743	0,9750	0,6023	0,8965
N-Alkaloid	-	0,189	0,378	0,181	0,362
N-Bakt.	0,4399	0,3853	0,5970	0,4213	0,5345

Alkaloideinwirkung 8 Tage; Ausgangsext. 0,374
je 5 ml Bakteriensuspension

5. Viskosität

Eindeutig reduzieren die Alkaloide der Atropagruppe in höheren Konzentrationen die starke Schleimbildung von Azotobakter. Während die Kontrolle und der Inhalt der Gefäße mit geringem Zusatz von 1:20 000 und 1:10 000 Alkaloid nach längerer Versuchsdauer zu fast unbeweglicher, gallertartiger Masse erstarrten, wirkte sich bereits nach wenigen Tagen eine Atropin- bzw. Hyoscyaminzugabe in einer Konzentration von 1:500 sehr deutlich aus. Nach geringem Viskositätsanstieg war bald erneut der "Wasserwert" - d.h. die Ausflußdauer von Leitungswasser - erreicht, und dieser vollständige Schleimverlust blieb nun für die Folgezeit erhalten. 1:1000 nahm meist eine Zwischenstellung ein.

Scopolamin wirkte gleichermaßen, jedoch wesentlich schwächer. Selbst die hohe Konzentration von 1:500 konnte die Schleimbildung nicht blockieren und rief noch eine gleichmäßig fortschreitende, wenn auch abgeschwächte Zunahme der Viskosität hervor (Abb. 21-24).

Abb. 21 Viskosität bei Atropinsulfat-Zusatz

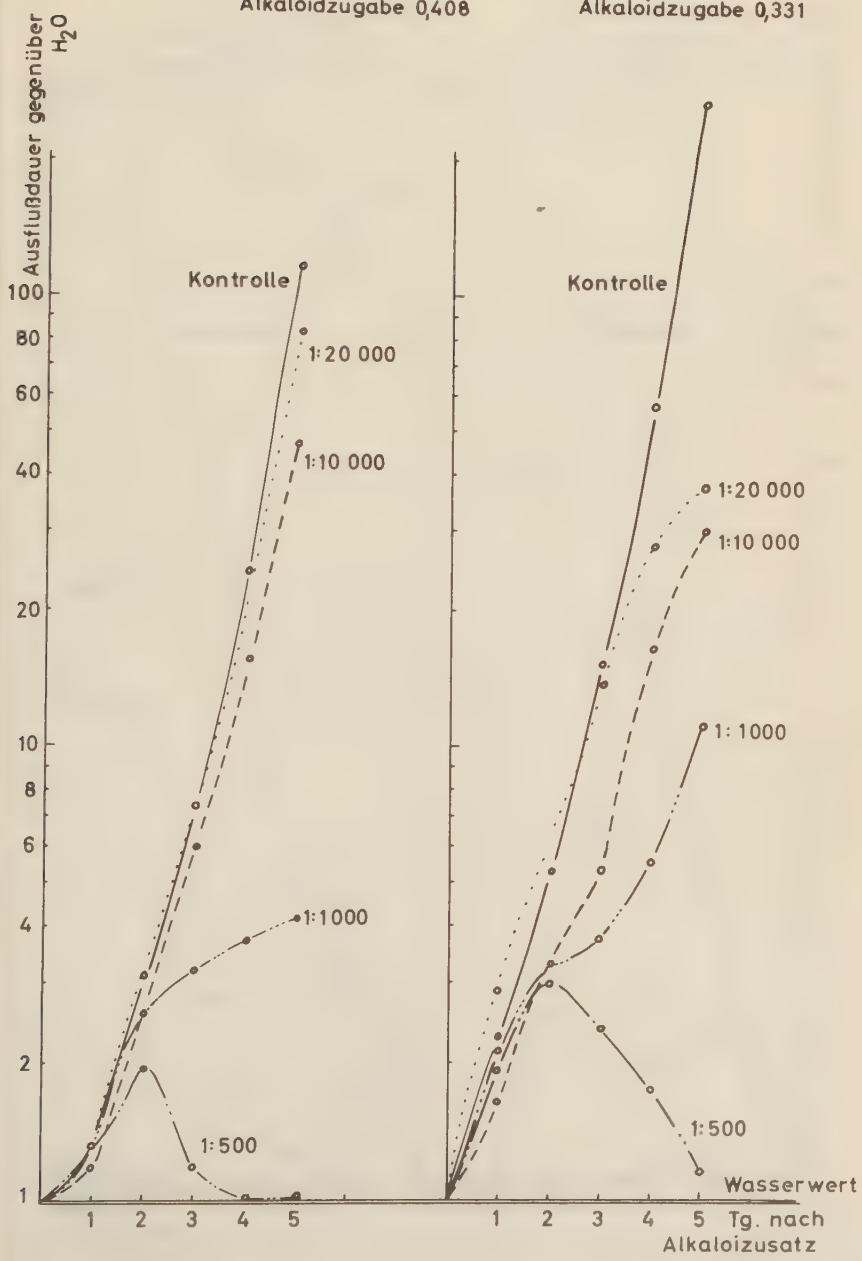


Abb. 22 Viskosität bei Hyoscyaminhydrobromid-Zusatz

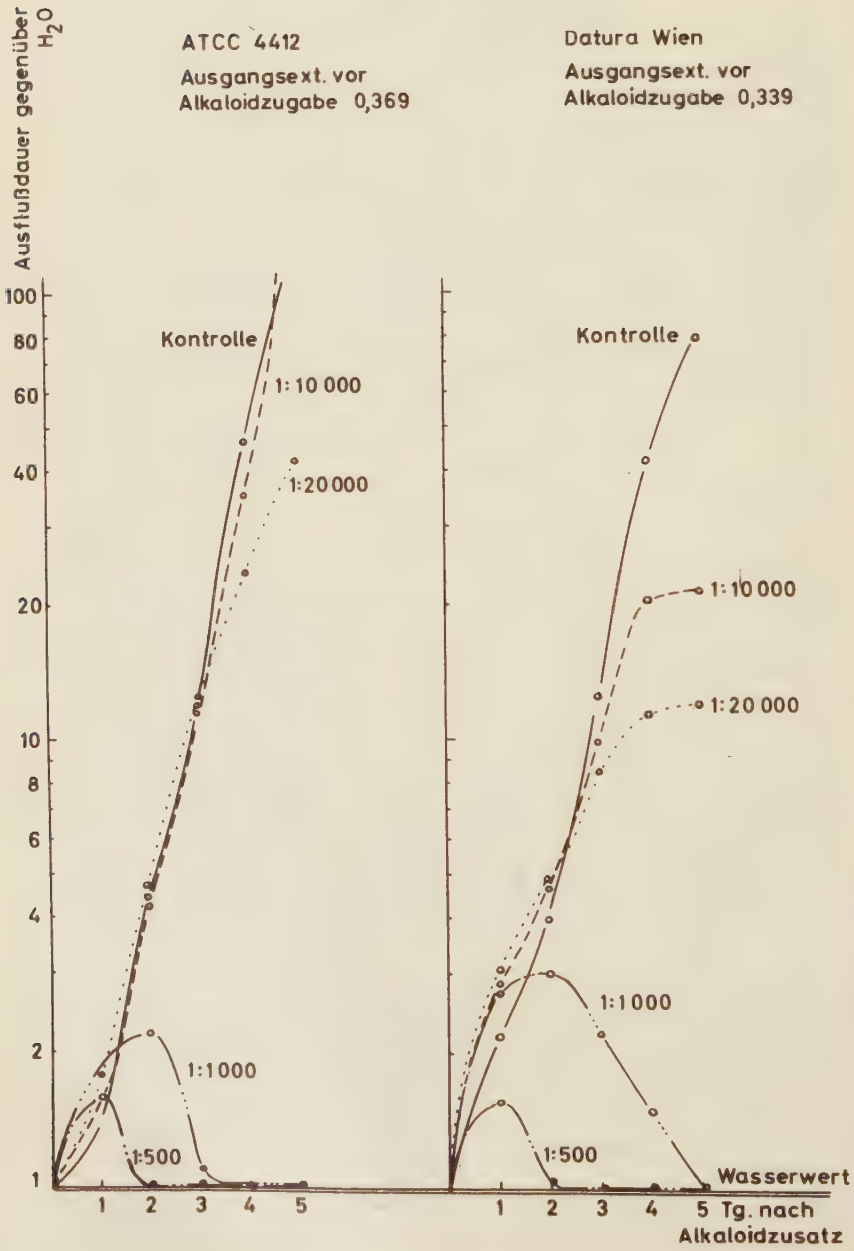


Abb.23 Viskosität bei Scopolaminhydrobromid-Zusatz

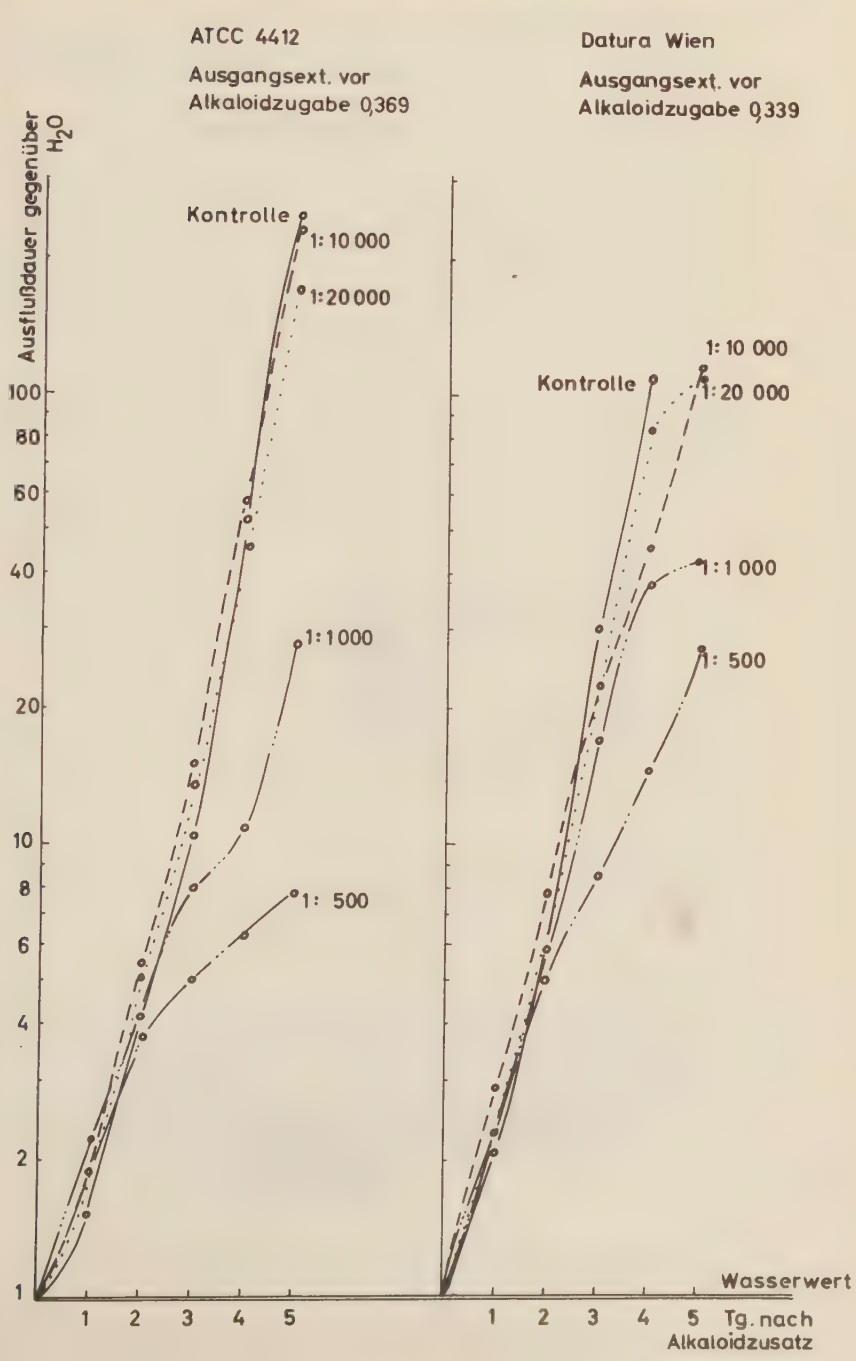
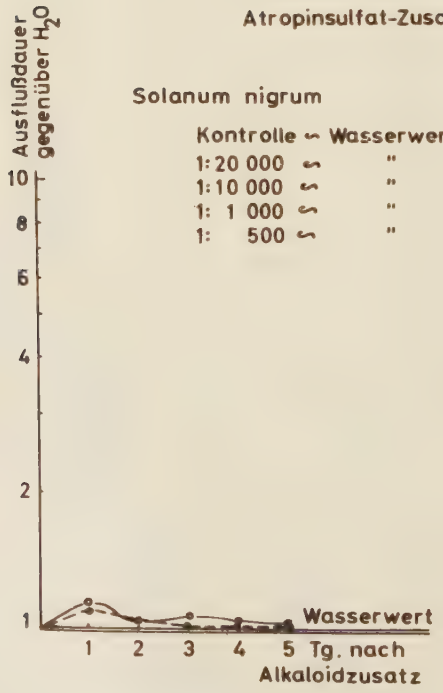


Abb. 24 Viskosität bei Atropinsulfat-Zusatz

Solanum nigrum

Kontrolle ∽ Wasserwert
1:20 000 ∽ "
1:10 000 ∽ "
1: 1 000 ∽ "
1: 500 ∽ "



Über die Hemmung der Schleimbildung durch äußere Einflüsse wurde bisher nur wenig berichtet.

SCHMIDT-LORENZ und RIPPEL-BALDES (1957) untersuchten die Wirkung des Sauerstoff-Partialdruckes auf Azotobakter chrooc. Bej. und fanden die stärkste Schleimbildung bei niedrigsten O_2-Drucken und eine Abnahme mit steigenden O_2-Partialdrucken. Sie zogen folgenden Schluß: Schleimbildung und andere nichteiweißhaltige Zellinhaltstoffe seien von O_2-Versorgung abhängig und würden durch partiellen Sauerstoff-Mangel gefördert. Wörtlich zitiert: "...denn bei konstanter Belüftungsintensität wird nach starkem Zuwachs von Zellsubstanz gegen Ende des Wachstums sehr viel mehr O_2 verbraucht als zu Wachstumsbeginn. Es wird also um so eher relativer O_2-Mangel eintreten, je niedriger der O_2-Partialdruck ist...".

Diese Abhängigkeit der Schleimbildung von der Belüftungsintensität können wir durch eigene Versuche bestätigen. Je kleiner die Bakterienmenge und je größer das Gefäß, um so geringer war die Schleimbildung. Um diese Fehlerquelle auszuschalten, brachten wir unsere Bakterienflüssigkeitskulturen auf eine Schüttelmaschine und wählten bei jeder Versuchsserie gleiches Ausgangsvolumen und gleiche Gefäßgrößen.

Außer der Abhängigkeit der Schleimbildung vom O_2-Partialdruck fanden die genannten Autoren eine weitere Zunahme bei höheren Zuckerkonzentrationen über 1,5 %.

DUUID und WILKINSON (1948) sahen den Grund einer Schleimbildung nicht im Einfluß von Einzelfaktoren. Nach ihrer Ansicht setzt sie immer dann ein, wenn irgendeiner der wesentlichen Nährstoffe außer Kohlenhydraten begrenzender Faktor für das Wachstum wird.

RADLER (1955) sah bei Azotobakter bei gesteigerter Wachstumsgeschwindigkeit und Stoffwechselaktivität in Belüftungskulturen die Stickstoff-Bindung als begrenzenden Faktor an. Ihm war die starke Reservesubstanzbildung, die erst gegen Ende des Wachstums und nur bei Bindung von Luftstickstoff und kaum bei N-heterotropher Ernährung auftrat, ein Beweis. SCHMIDT-LORENZ faßt dies folgendermaßen zusammen: "Wenn die N_2-Bindung ins Minimum kommt, wird der Stoffwechsel in Richtung Kohlenhydratüberschuß- oder Nebenstoffwechsel im Sinne von FORSTER (1949) auf Reservestoffbildung umgeleitet. Bei stärker gehemmter N_2-Bindung bei hohen O_2-Partialdrucken wird somit mehr Glukose zur Bindung von N_2 verbraucht und steht somit weniger für Kohlenhydratstoffwechsel zur Verfügung. Unter Umständen ist bei höheren O_2-Partialdrucken auch mit erhöhter Atmung zu rechnen."

Diese Feststellung konnte von FIFE (1943) bestätigt werden. Er fand bei niedrigsten O_2-Partialdrucken die geringste Atmung. Diese stieg fast proportional mit ansteigendem O_2-Druck. Er will weiter in verstärkter Veratmung der Kohlenstoffquelle die Ursache für verminderte Trockensubstanz und Schleimausbeute sehen.

So schön sich FIFES Resultate mit unseren eigenen Versuchsergebnissen decken, so wollen wir doch nicht versäumen, in diesem Zusammenhang auch MEYERHOF und BURK (1928) zu erwähnen, die bei Respirationsversuchen im WARBURG-Gerät zwischen Po_2 o,15 bis o,21 at stärkste Atmung fanden, die nach beiden Seiten schnell abnahm.

Nach WILSON und WILSON (1941) sind Wachstum und N_2-Bindung eine Funktion der Oberfläche der Kultur und nicht des Volumens. RIPPEL (1936), RIPPEL, BEHR und NABEL (1938) und BERTELS (1939) fanden entsprechend bei Zusatz von o,1 % Agar zur Kulturlösung eine Wachstumsförderung. RADLER (1955) erklärte dieses Phänomen auf folgende Weise: Durch

eine Viskositätserhöhung des Mediums werde die Sinkgeschwindigkeit der Bakterien herabgesetzt, und sie verblieben somit entsprechend länger in oberer Flüssigkeitsschicht. Nach SCHMIDT-LORENZ und RIPPEL-BALDES wird der prozentuale Eiweißgehalt der Bakterientrockenmasse im Laufe des Wachstums immer geringer. Als Art Reservestoff wahrscheinlich entsteht verstärkt nichteiweißhaltige Zellsubstanz. Diese wird im Falle von Azotobakter nicht in der Zelle, sondern in Form von Schleim in das umgebende Kulturmedium abgeschieden. Dies geschieht besonders intensiv gegen Ende des Wachstums. Die noch vorhandene Glukose wird fast völlig in Schleim umgewandelt, so daß über die Hälfte der Gesamttrockensubstanz nur aus dieser Reservesubstanz besteht. Nach völligem Glukoseverbrauch nimmt der Anteil gebildeten Schleims rasch ab und wird als zusätzliche C-Quelle genutzt, denn gleichzeitig gehen N-Bindung und Eiweißbildung noch einige Zeit weiter. Über die chem. Zusammensetzung des Schleimes berichten auch SCHLÜTER und BUKATSCH (l.c.).

6. Melaninbildung

Die Farbstoffbildung der Azotobakterstämme ist sehr variabel und wird mit bestimmt durch die Kulturbedingungen. Von Wichtigkeit für die Pigmentbildung sind neben Sauerstoffzufuhr (OMELIANSKY 1911, referiert von E.UNGERER (1934) vor allem die Kohlenstoffquellen. Kohlenstoffmangel fördert nach JONES (1913, referiert von E.UNGERER 1934) und RIPPEL (referiert von E.UNGERER 1934) die Pigmentbildung. Kohlenstoffüberschuß hemmt sie (STAPP und RUSCHMANN 1924). Nach BEIJERINCK (1902, referiert von E.UNGERER 1934) ist die Art der Kohlenstoffquelle von Bedeutung.

SCHLÜTER und BUKATSCH konnten in der Arbeit :" Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von Azotobakter" je nach gebotener Kohlenstoffquelle verschiedene Farbtypen und Intensitäten erzielen. Die Verfärbung der weißen Kolonie setzte immer an der Spitze der Schrägagarschicht ein, an der Stelle also, wo der Nährstoffgehalt früher erschöpft war.

In unseren eigenen Versuchen wurde das Wachstum mit erhöhter Alkaloidzugabe gehemmt. Die Bakterien verbrauchten somit weniger Vorratsstoffe. Ein Überschuß der C-Quelle verzögert die Melaninbildung erheblich. Nach wochenlanger Kultur setzte sie aber schließlich auch schwach bei einer Alkaloidzugabe in der Konzentration 1:500 ein.

a) ATCC 4412

Je 20 ml Bakteriensuspension mit einer Ausgangsextinktion von 0,408 vor Alkaloidzugabe.

Nach 2-tägiger Einwirkung von Atropinsulfat zeigten sich folgende Extinktionswerte:

Kontrolle	1 : 1 000	1 : 500
0,555	0,498	0,477

12 ml wurden entfernt. Die restlichen 8 ml blieben weitere 17 Tage auf der Schüttelmaschine. - Da der Gefäßboden nur dünn bedeckt war und gleichmäßig bewegt wurde, kann man annehmen, daß Durchlüftung und O_2-Druck ohne Einfluß blieben. - Es zeigte sich folgendes Bild :

Kontrolle	1 : 1 000	1 : 500
erstarrt, schokoladen-braun	dickflüssig, braun	flüssig, gleichmäßig hell-braun

b) Datura-Wien-Stamm

Je 2o ml mit der Ausgangsextinktion von o,331 vor Alkaloidzugabe. Nach 3-tägiger Einwirkung von Atropinsulfat zeigten sich folgende Extinktionswerte :

Kontrolle	1 : 1 ooo	1 : 5oo
o,595	o,552	o,546

Die restlichen 8 ml nach 16 Tagen - entspr. ATCC 4412-Versuch - zeigten folgendes Bild :

Kontrolle	1 : 1 ooo	1 : 5oo
erstarrt, schokoladenbraun	flüssig, gleichmäßig hell-braun	flüssig, unverändert gelblicher Farbton der urspr.Nährlösung ohne Spur von Melaninbildg.

c) Solanum nigrum-Stamm

Dieser Bakterienstamm zeigte sich völlig indifferent den gebotenen Alkaloiden gegenüber. Entsprechend trat auch keine Verzögerung in der Melaninbildung ein. Gleichzeitig wurde bei der gesamten Versuchsserie eine schwarz-braune Verfärbung sichtbar.

Aber ganz ohne Einfluß blieb auch hier eine Alkaloidzugabe nicht. Nach mehrwöchiger Versuchsdauer flockten - makroskopisch sichtbar - die Bakteriensuspensionen mit Alkaloidzusatz 1 : 1 ooo und 1 : 5oo völlig aus, während eine Zugabe in der Größenordnung 1 : 2o ooo und 1 : 1o ooo zu nur unwesentlicher, vereinzelter Klumpenbildung führte. Die Kontrollen zeigten unverändert eine gleichmäßige Suspension. Eine pH-Verschiebung und damit ein Einfluß des IEP war nicht der Grund, wie wiederholt geprüft wurde.

4. Teil

Wirkung natürlicher Pflanzensäfte auf Azotobakter

Bisher durchgeführte Versuche zeigten das verschiedene physiologische Verhalten von Azotobakter bei Zusatz von Salzen der Atropa-Alkaloide. Wir gaben diese Reinsubstanzen - Reinheitsnachweis erfolgte chromatographisch - in wässriger Lösung und in genau berechneten Konzentrationen zu und erhielten die in Teil 3 aufgeführten Effekte.

Ergaben sich Beobachtungen auch bei Verwendung natürlicher Pflanzensäfte ?

Wir weichten zu diesem Zweck eine große Anzahl von Datura-Samen in Wasser ein. Diese grünliche Flüssigkeit (= Eluat) ließen wir in Mannit-Agarplatten eindiffundieren :

bei Serie I relativ kurz
bei Serie II etwas länger.

Anschließend wurde der Nährboden getrennt mit ATCC 4412 und Datura-Wien beimpft. Beide Bakterienstämme verhielten sich gleich.

Die schwächere Konzentration ergab eine Förderung d.Wachstums, die stärkere Konzentration ergab eine Hemmung des Wachstums.

Zu den Atmungsversuchen wählten wir eine sehr dichte ATCC 4412-Kultur mit einer Extinktion von o,576. Nach Zusatz von 3 ml (+ 3 ml H_2O) bzw. 6 ml jenes grünen Sameneluats - Kontrolle + 6 ml H_2O - blieben die 5o ml Kölbchen mit insgesamt 2o ml Inhalt 6 Tage auf der Schüttelmaschine.

Die geringere Konzentration wirkte sich schwach fördernd, die höhere leicht hemmend auf die Atmungswerte aus. Zu diesem Zeitpunkt waren folgende Extinktionen erreicht :

Kontrolle	Serie I	Serie II
+ 6 ml H_2O	+ 3 ml H_2O + 3 ml Eluat	+ 6 ml Eluat
o,688 Ext.	o,755 Ext.	o,7oo Ext.

Die Extinktionswerte der farblosen Kontrolle durften nicht mit den leicht grün erscheinenden übrigen Kulturen verglichen werden.

Die Serie I jedoch zeigte - trotz geringeren Zusatzes und somit schwächerer Eigenfärbung - gegenüber der Serie II eine größere Dichte, was für eine Förderung sprach.

Selbst die Viskositätsbestimmungen bestätigten unsere früheren Ergebnisse.

Kontrolle	Serie I	Serie II
loo %	8o %	4o %

Nach 6-tägiger Einwirkungszeit entsprechend den Atmungsversuchen.

Diese Resultate bestärkten uns in der Annahme, daß die von uns untersuchten, durch reinen Alkaloidzusatz veränderten Stoffwechselvorgänge in ähnlicher Weise auch in der Natur durch Pflanzensäfte hervorgerufen werden können.

Wässrige Auszüge von Datura- und Solanum-nigrum-Wurzeln sowie das Auflegen angeschnittner Wurzelstückchen (längs und quer) dieser Pflanzen riefen ebenfalls auf Mannit-Agarplatten eine Veränderung in der Wuchsform unserer Bakterienstämme her-

vor. Während Solanum-nigrum-Stückchen bei dem arteigenen Azotobakter sich fördernd auswirkten oder unwirksam blieben, zeigten die übrigen Bakterienstämme im Diffusionsbereich eine starke Tendenz zur Auflösung der makroskopisch sichtbaren, deutlich abgegrenzten Einzelkolonien. In diesen relativ weitreichenden Bezirken ähnelten somit ATCC 4412 und Datura-Wien phänotypisch dem Solanum-nigrum-Bakterienstamm.

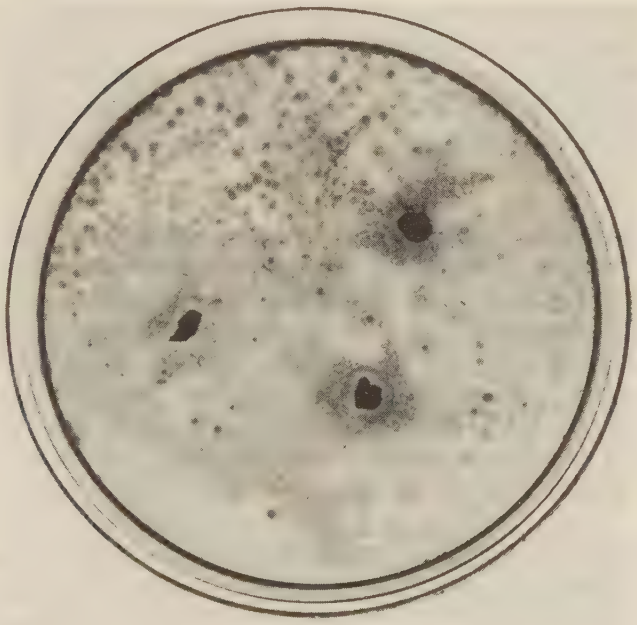


Abb. 25: Datura-stram.-Wurzelstückchen quer auf einer Datura-Wien-Bakterienplattenkultur :

Schon nach 3 Tagen zeigte sich obiges Phänomen: Auf einen schmalen Hemmungsstück folgte in einem sehr weiten Diffusionsbereich gefördertes, im Aussehen stark verändertes Bakterienwachstum.

Diskussion

Wir fanden unter natürlichen Lebensbedingungen ein enges Zusammenleben von Azotobakter und bestimmten alkaloidreichen Pflanzen und versuchten, an Hand gezielter Experimente eine wechselseitige Beeinflussung der Pflanze auf das Bakterium und umgekehrt aufzuzeigen.

Als Teststoffe wählten wir die Tropaalkaloide, die Hauptbasen der Solanaceen. Trotz der relativ geringen Mengen dieser kompliziert gebauten Stickstoffderivate in Datura stram. konnten wir durch die Infektion der steril vorbereiteten Pflanzen mit ATCC 4412 eine Verschiebung im Alkaloidgehalt erreichen, die auf eine verbesserte Alkaloidbildung unter dem Einfluß des N_2-bindenden Rhizosphärenbakteriums hinweist.

Eine Zugabe der Salze der entsprechenden Alkaloide - Atropinsulfat, Hyoscyaminhydrobromid, Scopolaminhydrobromid - zu Kulturen verschiedener Azotobakterstämme hatte ebenfalls physiologische Folgen. Dabei zeigten der amerikanische Bakterienstamm ATCC 4412 und der vom Stechapfel selbst isolierte Stamm "Datura-Wien" ziemlich gleiches Verhalten. Ihre Stoffwechselvorgänge wurden bei einer Alkaloidzugabe von 1:1 ooo und 1:5oo in geringem Ausmaß verändert: Wachstum und Melaninbildung erschienen gehemmt, die Atmung war dagegen gefördert.

Besonders deutlich wirkte sich der Einfluß der Salze Atropin und Hyoscyamin auf die Viskosität der Kulturlösungen aus. Bei einer Konzentration von 1:5oo trat eine völlige Hemmung der Schleimbildung ein, so daß die Viskosität dem Wasserwert entsprach. Bei Scopolamin lagen die Verhältnisse im ganzen nicht so klar.

Ein weiterer, selbst isolierter Bakterienstamm aus der Rhizosphäre von Solanum nigrum - mit dem Hauptalkaloid Solanin - verhielt sich den Atropaalkaloiden gegenüber fast indifferent. Im Gegensatz zu ATCC 4412 und Datura-Wien bildete dieses Bakterium niemals Schleimhüllen.

Scopolamin erwies sich ganz allgemein bei entsprechenden Konzentrationen als weniger wirksam im Vergleich zu Hyoscyamin und Atropin. Bei geringerer Viskositätsverminderung selbst bei der hohen Konzentration von 1:5oo zeigten Wachstum, Atmung usw. ebenfalls nur kleine Veränderungen gegenüber der Kontrolle. Wir können daher annehmen, daß der Hauptangriffspunkt der genannten Salze der Tropaalkaloide in der verminderten Schleimausscheidung zu sehen ist. Wachstum, Atmung usw. werden erst sekundär dadurch beeinflußt.

Die Vermutung, daß es wirklich die Alkaloide sein könnten, die Azotobakter begünstigen, ist nicht ausgeschlossen. In der Natur dürfte die Alkaloidausscheidung nur eine unter vielen anderen Ursachen sein, und vielleicht ist es gerade eine besondere Kombination vieler Stoffe zusammen, die sich fördernd auf das Bakterienleben auswirkt, sofern die Alkaloide in nicht zu hoher Dosis auftreten.

Wenden wir uns nun der Bakterien-Wirkung auf die höhere Pflanze zu und fragen, wie sich eine Veränderung im Alkaloidgehalt durch Infektion mit Azotobakter vorstellen läßt. Bakterielle Stoffwechselausscheidungen, die die Pflanze einfach aus dem Boden aufnehmen könnte, sind bisher wenig bekannt.

Greifen wir nochmals zurück auf einige der verschiedenen Synthesewege von Hyoscyamin, so wollten MORTINER im Tryp-

tophanstoffwechsel, ROBINSON im Ornithin den Grundstein für das Tropangerüst sehen. Für MOTHES waren potentielle Vorstufen der Alkaloide Aminosäuren, die entweder die Pflanze synthetisiert oder die beim Eiweißzerfall entstehen.

Nun werden von Azotobakter 17 Aminosäuren und Glukosamin gebildet, wobei aber die Aminosäureabscheidung der auf Mannit gewachsenen Stämme sehr gering ist. Wahrscheinlich treten sie erst später in autolytisch zerfallenden Kulturen in Erscheinung. Es konnte u.a. auch Tryptophan nachgewiesen werden. (Vgl. BUKATSCH-BURGER-SCHLÜTER, 1956). Vielleicht ist weiterhin das "Azotobakter-Exkret IES" nicht unwesentlich.

MOTHES wirft als Frage auf, warum hauptsächlich die Alkaloidbildung in der Wurzel erfolge . - Man weiß heute, daß der Sproß keineswegs unfähig zur Synthese in jüngsten, noch wachsenden Teilen ist. - Vielleicht sind im Boden in Bezug auf die N-Versorgung bessere Voraussetzungen als im Blatt gegeben.

Zusammenfassung

(entsprechend den Kapiteln des vorliegenden Textes)

I. Von Datura-Samen, Solanum-nigrum- und Papaver-Wurzeln wurden verschiedene Azotobakterstämme isoliert und rein weitergezüchtet. Der Stamm der Mohnpflanzen schied für weitere Versuche auf Grund seines langsamen Wachstums aus. Von Wurzeln von Corydalis und Convallaria ließen sich in keinem Falle Azotobakter-Kulturen gewinnen.

II. Die Infektion junger, steriler Datura-stramonium-Kulturen mit ATCC 4412 bewirkte eine Alkaloidzunahme.

III. 1 a) ATCC 4412 und der selbst isolierte Bakterienstamm "Datura-Wien" ließen sich phänotypisch nicht unterscheiden und verhielten sich auch weitgehend physiologisch gleich. Beide zeichneten sich durch starke Schleimbildung aus. ATCC 4412 zeigte sich im allgemeinen Alkaloideinflüssen gegenüber etwas empfindlicher.

b) Eine Zugabe von Atropinsulfat bzw. Hyoscyaminhydrobromid in einer Konzentration von 1:500 hemmte das Wachstum und verzögerte stark die Melaninbildung dieser beiden Stämme.

c) Der Stickstoffumsatz wurde nicht verändert: der Stickstoffgehalt stand in einem normalen Verhältnis zu dem jeweils ermittelten Trockengewicht und zur Wachstumsrate.

d) Die Atmungswerte zeigten unter Alkaloideinfluß meist eine geringe Förderung gegenüber der Kontrolle.

e) Die Schleimbildung wurde bei den Stämmen ATCC 4412 und Datura-Wien mit steigender Alkaloidgabe zunehmend blockiert. Die Viskosität sank nach kurzem Anstieg auf den "Wasserwert" zurück. Verringerung der Viskosität könnte erleichterten Gasaustausch bedeuten, was auf die Atmungsintensität sich günstig auswirken kann.

f) Konzentrationen von 1:2o ooo und 1: lo ooo blieben unwirksam, während eine Zugabe jener Basen in der Größenordnung 1:1 ooo eine Mittelstellung zwischen dem Verhalten von Kontrolle und Versuchsserien mit Zusatz von 1:5oo einahm.

g) Bei Scopolamin lagen die Verhältnisse nicht so eindeutig:
die höhere Konzentration von 1:5oo reduzierte zwar die Schleimbildung, konnte sie jedoch nicht blockieren.
Wachstum und Atmung wurden dabei schwach gefördert.

2 a) Der "Solanum-nigrum" Stamm unterschied sich bereits äußerlich in seiner Wuchsform und weiterhin in seinem physiologischen Verhalten deutlich von ATCC 4412 und "Datura-Wien". Dieses Bakterium wies niemals Schleimhüllen auf.

b) Der "Solanum-nigrum" Stamm zeigte sich nahezu indifferent den drei genannten Alkaloiden gegenüber. Erst nach längerer Versuchsdauer bewirkten die Konzentrationen 1:5oo und 1:1 ooo ein Ausflocken der Bakterien in der Flüssigkeitskultur - im Gegensatz zu der gleichmäßig verteilten Suspension der Kontrolle. Es kam dabei jedoch zu keiner Reaktionsverschiebung, die eine Annäherung an den IEP ergeben könnte.

IV. 1) Wurzelstoffe von "Datura-stram." und "Solanum-nigrum" beeinflußten das Wachstum der Azotobakterstämme ATCC 4412 und Datura-Wien auf der Plattenkultur im Diffusionsbereich, Wurzelstückchen weitgehend fördernd, wässrige Wurzelauszüge hemmend.

2) Datura-Samen-Eluat rief bei ATCC 4412 ähnliche Stoffwechselveränderungen hervor, wie sie bei Atropin bzw. Hyoscyamin aufgeführt sind.

Literatur-Verzeichnis

ANDERSON, G.R.: Ekology of Azotobacter in soils of the Palous region, II Responses to environmental changes, Soil Sci. 86, 111-116 (1958)
Ref.Ber.wiss.Biol. 134, 16o (1959)

AZIM, M.A. u. M.SHAFI: Effekt of Azotobacter on fixed nitrogen, J.Indian Chem. Soc. 34, 78o-782 (1957).
Ref.Ber.wiss.Biol. 123, 29o (1958).

BELOZERSKY, A.N., G.N.SAIZEVA u. N.P.TULENEVA: Chemistry of the Azotobacter, Mikrologija 27, 7-11 (1958).
Ref.Ber.wiss.Biol. 125, 63 (1958).

BELOZERSKY, A.N., N.I.PROSKURJAKOW: Praktikum der Biochemie der Pflanzen, S. 12o, Veb. Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1956).

BOIT, H.-G.: Ergebnisse der Alkaloid-Chemie bis 196o, unter besonderer Berücksichtigung der Fortschritte seit 195o, S. 58-85, Berlin, Akademie-Verlag 1961.

BORTELS, H.: Über die Wirkung von Agar sowie Eisen, Molybdän, Mangan u. anderen Spurenelementen in stickstoffreier Nährlösung auf Azotobacter, Zbl. Bakter. II, 1oo, 373 (1939).

BUCHERER, H.: Über den mikrobiellen Abbau von Nikotin, I.Mitt. Zbl.Bakt., Abt. II, 1o5, 166 (1942).
II. Mitt. Zbl. Bakt., Abt. II 1o5, 445 (1943).

BURGER, K. u. F. BUKATSCH: Über die Wuchsstoffsynthese im Boden freilebender N-bindender Bakterien, Zbl. Bakt. Abt. II, 111, 1-28 (1958).

BUKATSCH, F.: Zur Analyse der Bakterienhemmstoffe aus der Wurzel vom Schöllkraut und ähnlichen Pflanzen, Arch.Mikrobiologie, 24, 281-296 (1956).

BUKATSCH, F. u. J. HEITZER: Beiträge zur Kenntnis der Physiologie von Azotobakter, Arch. Mikrobiologie 17, 79-96 (1952).

BUKATSCH, F., K. BURGER u. M. SCHLÜTER: Untersuchungen über Eiweiß und Eiweißstoffwechsel bei Azotobakter, Zbl. Bakt. II, 1o9, 226-235 (1956).

CALIFORNIA AGRICULTURE: Germination inhibited by Seed-Borne Chemicals, Reports of Progress in Research by the California Agricultural Experiment Station Vol. 14, Number 6, June 1960.

CARR, L. B.: Observations on the capsule of Azotobacter agilis, J. Bact. 76, 119-120 (1958). Ref. Ber. wiss. Biol. 134, 110 (1959).

COTA-ROBLES, E.H., A.G. MARR u. E.H.NILSON: Submicroscopic particles in extracts of Azotobacter agilis, J.Bacter. 75, 243-252 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 128, 132 (1958).

CROCHER, W., L.v.BARTON: Physiology of Seeds, S. 219, USA (1957).

CROMWELL, B.T.: Studies on the synthesis of hyoscyamine in Atropa belladonna L. and Datura stram. Biochemic. J. 37, 717 (1943). Literaturhinweis bei MOTHES, K.: Referat ..S.49

DAPER, D.G.M., S.KIRKWOOD u.L.MARION: Die Biogenesis of alkaloids III. A study of hyoscyamine biosynthesis using isotopic putrescine, Cand.J.Chem. 29, 964 (1951).Literaturhinw.b.MOTHES, K.: Ref. .. S.49

ESSER, P.: Die Giftpflanzen Deutschlands. Braunschweig 1910.

EVANS, W.C. u.M.W.PARTRIDGE: Alkaloid biogenesis II. Changes in the ontogenetic production of Alkaloids in Atropa and Datura. J.of Pharmacy and Pharmacol 5, 772 (1953). Literaturhinweis bei MOTHES, K.: Referat...S.49

FLOETHMANN, E.: Cytologische Untersuchung an Azotobacter chrooc Beij., Arch. Mikrobiolog. 20, 243-260 (1954). Ref.Ber.wiss.Biol. 93, 172 (1955).

GODOR, G., J.TOTH, I.KROCZOR, P.DOBO u.I.WEISZ-VINCZE: The total synthesis of Scopolamine, Chem. and Ind., 764 (1956). Literaturhinweis bei MOTHES, K.: Referat...S.49

GEIGER, Ph.L. u. HESSE: Literaturhinweis b.WORKER, G., S. 2 Ann. d. Pharm., 7, 270, 274, 276 (1833).

HESSNER, O.: Die Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa, S. 1-91, Heidelberg 1931.

GUSEVA, A.R. u. V.A.PASESHNICHENKO: A study of potato glycoalkaloids with the use of labelled atoms, Biochimija 23, 412-415 (1958).
Ref.Ber.wiss.Biol. 130, 50 (1959).

HEGNAUER, R.: Ober de alkaloide-ontogenese bij. Solanaceen, Pharmaceut. Weekbl. 86, 805 (1951).
Literaturhinweis bei MOTHES, K.: Referat....S.49

HENRY, T.A.: The Plant Alkaloids, 2nd ed. S. 62-94, Church. London (1924).

JINDRA, A., S.ZADRAZIL, V.JIRACEK u.I.SYROVY: Über Alkaloidsynthese III. Einfluß der Manganionen auf Agrinaseaktivität, Alkaloidgehalt und Stickstoffmetabolismus im Stechapfel (Datura stram.), Planta med. (Stuttgart) 7, 174-184 (1959)
Ref.Ber.wiss.Biol. 143, 57 (1960).

JOSE, A.G. jr. u. P.W.WILSON: Metabolis activities of subcellular particles from Azotobacter vinelandii, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 45, 692-697 (1959).
Ref.Ber.wiss.Biol. 140, 146 (1960).

LEETE, E., L.MARION u.I.D.SPENSER: The biogenes of Alkaloids XII. The mode of formation of the tropine base of Hyoscyamine, Canad. J. Chem. 32, 1116-1123 (1954).
Ref.Ber.wiss.Biol. 96, 184 (1955).

LEETE, E., L.MARION u.I.D.SPENSER: Biogenesis of Hyoscyamine, Nature (London) 174, 650-651 (1954).
Ref.Ber.wiss.Biol. 94, 234 (1955).

LINSKENS, H.F.: Praktikum der Papierchromatographie, Springer-Verlag 1961.

MANSKE, R.H.F. u. H.L.HOLMES: The Alkaloids, Vol. I, Chapt. VI, by H.L. HOLMES.
Vol. VI, Chapt. I, by K. MOTHES, Chapt. V by G.FODOR, Academic. Press Inc., Publishers, New York (1950, 1960).

MARION, L. u. A.F.THOMAS: A further observation on the biogenis of hyoscyamine, Canad. J. Chem. 33, 1853 (1955)
Literaturhinweis bei MOTHES, K.: Referat ..S.50

MOLISCH, H.: Pflanzenchemie und Pflanzenverwandtschaften, S. 65-68, Fischer-Verlag, Jena (1933).

MOTHES, K. u. A.ROMEIKE: Zur Frage der Alkaloidumwandlung im Sproß, Naturwiss. 42, 631 (1955), Flora 142, 1o9 (1954).

MOTHES, K., A.ROMEIKE u. H.-B. SCHRÖTER: Über Mutationsversuche an Alkaloidpflanzen, Naturwiss. 42, 214 (1955).

MOTHES, K.: Festschrift über die Sertürner-Gedenkfeier 1954, Stuttgart (1955).

MOTHES, K.: Referat über Arbeitstagung vom 8.-12.1o.1956 mit dem Thema: Biochemie und Physiologie der Alkaloide, Abh. d. Deutschen Akad. d. Wiss. zu Berlin, Klasse f. Chemie, Geologie u. Physiologie, Nr. 7 Jahrg. 1956.

NETTER, H.: Biologische Physikochemie, S. 117, Akad. Verlagsgesellschaft Athenaion Potsdam (1951).

NIEMER, H., H. BUCHERER u. A. KOHLER: Über den Abbau von Atropin durch Corynebacterium belladonnae, Zeitschr. physiol. Chemie 317, 238-242 (1959).

OMELIANSKY, W.L. u. N.O.SIEBER: Zur Frage nach der chem. Zusammensetzung des Azotobacter chrooc., Ztschr.physiol. Chemie 88, 445-459 (1913).

PAECH, K. u. M.TRACEY: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Band IV, The Alkaloids by CROMWELL, S. 367, 496-5oo, Springer-Verlag (1955).

POCHON, J. u. H.de BARJAC: Interactions entre la croissance des Azotobacter et celle du mais, Ann. Inst. Pasteur (Paris), 94, 419-427 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 134, 199 (1959).

POSCHENRIEDER, H.: Azotobakter als Boden- und Wurzelbakterium, Diss. Weihenstephan 1926.

RADLER, F.: Untersuchungen über den Verlauf der Stoffwechselvorgänge bei Azotobakter chrooc., Arch. Mikrob. 22, 335-367 (1955).

RAMSHORN, K.: Pflanzenphysiologische Wirkungen der Alkaloide, Flora 142, 6o1 (1955).

RAUEN, H.M.: Biochem. Taschenbuch, S. 46o, Springer-Verlag (1956)

RIPPEL, A.: Handbuch der Bodenlehre, 1. Ergänzungsband, S. 490-491, Berlin (1939).

RIPPEL, A.: Untersuchungen über Antibiotika aus höheren Pflanzen und ihre Bedeutung für die Bodenmikrobiologie und Pflanzensoziologie, Naturw. 38, 262 (1951).

RIPPEL-BALDES, A.: Grundriss der Mikrobiologie, Berlin-Göttingen (1947).

RIPPEL, A., G.BEHR u. K.NABEL: Über die Eiweißbildung durch Bakterien, Arch. Mikrobiol. 9, 375-409 (1938).

ROMEIKE, A.: Beiträge zur chem. Physiologie der mydriatisch wirkenden Solanaceen-Alkaloide, Pharmazie 8, 668-674 u. 729-747 (1953).

ROMEIKE, A.: Über die Mitwirkung des Sprosses bei Ausbildung des Alkaloidspektrums. Epoxydbildung beim Hyoscyamin durch Datura ferox L., Flora (Jena) 143, 67 (1956).

ROMEIKE, A.: Papierchromatographische Trennung der Atropaalkaloide, Pharmazie 7, 496 (1952).

SAIZEVA, G.N. u. A.N.BELOZERSKY: Chemistry of Azotob., Mikrobiologiga (Mosk.) 27, 416-421 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 133, 173 (1959).

SALLE, A.J.: Fundamental Principles of Bacteriology, Chpt.24, New York, Toronto, London (1954).

SCHULTZ, O.E. u. F.ZYMALKOWSKY: Die quantitative Bestimmung der Alkaloide in Drogen und Drogenzubereitungen, S. 127, Ferdin. Enke Verlag Stuttgart (1960).

SEVEREN, R. v.: Contribution a l'etude des solanacees. La biosynthese des alkaloides de Datura tatula, var. inermis, J. Pharm. Belg. N.S. 14, 36-44 (1959). Ref.Ber.wiss. Biol. 141, 285 (1960).

SCHLÜTER, M. u.F.BUKATSCH: Physiologische Untersuchungen zur Rassenfrage von Azotobacter, Zbl.Bakt.II, 112, 509-543 (1959).

SCHMIDT-LORENZ W. u. RIPPEL-BALDES A.: Wirkung des Sauerstoff-Partialdrucks auf Wachstum und Stickstoffbindung von Azotobacter chrooc. Beij., Arch.Mikr. 28, 45-68 (1957).

SCHUSTER, G.: Untersuchungen über die Auswirkungen von Virusbefall auf den Alkaloidgehalt von Datura stram. L. var. stram. Phytopath. Z. 31, 123-132 (1957) Ref.Ber.wiss.Biol. 123, 45 (1958).

SCHUSTER, G.: Untersuchungen über die Auswirkungen von Virusbefall auf den Alkaloidgehalt verschiedener Arten und Sorten der Gattung Nicotiana L., Phytopath. Z. 32, 335-339 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 129, 298 (1959).

SHIPILENIA, S.E.: The Effekt of foliar nutrition on the content of alkaloids and chlorophyll in leaves of Datura inermis Jacq., Dokl. Akad. Nauk SSR 124, 944-946 (1959). Ref.Ber.wiss.Biol. 138, 3oo (1959).

SPICHER, G.: Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Azotob. chrooc. und höheren Pflanzen, Zbl. Bakt. II, 1o7, 353-383 (1954). Ref.Ber.wiss.Biol. 91, 4o4 (1954).

STAPP, C.: Über die Reserveinhaltsstoffe undden Schleim von Azotob. chrooc., Zbl. Bakt. II, 61, 276-292 (1924).

STAPP, C. u. RUSCHMANN: Zur Biologie von Azotob., Arb. biol. Reichsanstalt Land- u. Forstw. 13, 3o5-368 (1924

STIENSTRA, Th. M.: Formation of mydriatic alkaloids in excised root cultures of Datura stram. grown on a completely synthetic nutrient, Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch., Ser. C. 57, 584-593 (1954). Ref.Ber.wiss.Biol.96, 184 (1955).

STILLE, B.: Beobachtungen über das Verhalten von Azotob. im Wurzelbereich höherer Pflanzen, Arch. Mikrobiol. 31, 255-261 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 132, 285 (1959).

STOKES, J.L. u. M.GUNNES: The Amino Acid Composition of Mikroorganisms., J. Bact. 52, 195-2o7 (1946).

TISSIERE, A., H.G. HOVENKAMP u. E.C.SLATER: The respiratory enzyme systems of Azotob. vinelandii, biochem. et biophysica acta (Amsterd.) 25, 336-347 (1957). Ref.Ber.wiss.Biol. 12o, 175 (1958).

UNGERER, E.: Über die Entstehung des Pigmentes von Azotob. chrooc., Z.Pflanzenern., Düngung und Bodenkunde, A 36, 287-29o (1934).

VANCURA, V., I. MACURA, O. FISCHER u. J. VONDRACEK: The relation of Azotob. to the root system of barley. Folia Microbiol. (Praha) 4, 119-129 (1959). Ref.Ber.wiss.Biol. 138, 80 (1959).

VOETS, J.P.: The oxydation of benzoic acid by Azotobacter, Naturwissenschaften 45, 386 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 134, 147 (1959).

WEHMER, C.: Die Pflanzenstoffe II S. 1080, 1106, 2. Aufl. Fischer-Verlag Jena (1931).

WINTER, A.G.: Nahrung und Boden - ein Beitrag zum Problem des Wirkstoffkreislaufs. Münchn. Med.Wochenschrift 102, Nr. 49 (1960), 2433-2438, Düngung und "biologischer Wert" der Nahrung, Nr. 50, 2499-2503, Hippokrates Z. prakt. Heilkunde Heft 1, 56-62 (1959).

WINTERSTEIN, E. u.G. TRIER: Die Alkaloide, S. 251, 261 Berlin (1910).

WORKER, G.: Die Chemie der natürlichen Alkaloide, 1. Hälfte S. 41, Ferd. Enke Verlag Stuttgart (1953).

ZEISS-Werkzeitschrift: Bestimmung von Substanzen an Papierchromatographie durch Transmissions- und Reflexionsmessung mit dem Spektralphotometer, Mitteilungen über Fortschritte der technischen Optik, 2. Bd., 1. Heft S. 1-13 März (1960).

ZINOVIEVA, Kh. T.: The effekt of root excretion and root extracts of certain agricultural plants upon Azotob., Mikrobiologija 27, 75-81 (1958). Ref.Ber.wiss.Biol. 125, 207 (1958).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr.L. Brauner, Vorstand des Botanischen Instituts, für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. F. Bukatsch für die Überlassung des Themas, die stete, beratende Anteilnahme und Unterstützung. Herrn Professor Dr.H.Niemer verdanke ich mehrere Proben von Alkaloid-Reinsubstanzen. Den Angestellten des Botanischen Instituts danke ich ebenfalls, insbesondere Herrn Krause für die photographischen Aufnahmen. Wertvolle Literaturhinweise vermittelte mir ein Einblick in die Bibliothek des pharmazeutischen Instituts; dem Vorstand desselben, Herrn Professor Dr.L. Hörhammer, bin ich dafür sehr verbunden.

Lebenslauf

Am 24. Dezember 1935 wurde ich als Tochter des Oberregierungsrates Konrad Vaupel und seiner Ehefrau Else geb. Leonhäuser in Delitzsch bei Leipzig geboren. Im Herbst 1942 trat ich in Karlsruhe in Baden in die Volksschule ein. Im September 1944 fiel unsere Wohnung einem Bombenangriff zum Opfer. Unser neuer Wohnsitz wurde Kirchhain, Kreis Marburg/Lahn. Durch die schlechten Nachkriegsverhältnisse war ich gezwungen, nach 4 Jahren Grundschule zunächst in die dortige staatliche Mittelschule einzutreten. Kurz vor der Versetzung nach Quarta konnte ich dann die Elisabethschule, ein Realgymnasium für Mädchen in Marburg/Lahn, besuchen, wo ich am 29. Februar 1956 die Reifeprüfung ablegte. Mit dem Sommersemester 1956 begann mein Studium der Naturwissenschaften an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Brs.; nach dem 3. Semester immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität München. Im Frühjahr 196o übernahm ich bei Professor Dr. F. Bukatsch eine Doktorarbeit auf physiologisch-mikrobiologischem Gebiet.